

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD LÍTICA DEL PÉPTIDO MELITINA SOBRE *Neochloris*
oleoabundans (CHLOROPHYTA) PARA POTENCIAR LA EXTRACCIÓN DE
LÍPIDOS.

Por:

Q.B.P. MAGDA PATRICIA VARGAS PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Enero ,2019

**ACTIVIDAD LÍTICA DEL PÉPTIDO MELITINA SOBRE *Neochloris*
oleoabundans (CHLOROPHYTA) PARA POTENCIAR LA EXTRACCIÓN
DE LÍPIDOS.**

Comité de tesis

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Presidente

Dra. Myriam Elías Santos
Secretario

Dr. Arcadio Valdés González
Vocal

Dra. Isela Quintero Zapata
Vocal

Dr. Abelardo Chávez Montes
Vocal

**ACTIVIDAD LÍTICA DEL PÉPTIDO MELITINA SOBRE *Neochloris*
oleoabundans (CHLOROPHYTA) PARA POTENCIAR LA EXTRACCIÓN
DE LÍPIDOS.**

Dirección de Tesis

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Director

Dra. Azucena del Carmen González Horta
Director externo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo Luna por recibirme en su laboratorio hace 7 años, los cuales han sido de mucho aprendizaje debido a sus valiosos consejos académicos y de vida. Gracias por darme su amistad y confianza para atender las responsabilidades del laboratorio.

A la Dra. Azucena González por su excelente y valiosa guía durante el proyecto, además por permitirme hacer uso de su laboratorio. Pero más aún por su entrega, su paciencia y su incondicional apoyo, he aprendido de usted cosas que dejan huella. Estaré siempre muy agradecida.

Al Dr. Abelardo Chávez por sus consejos y su tiempo durante la realización de la tesis, siempre haciéndome ver el lado positivo de las cosas.

Al Dr. Arcadio Valdés por formar parte del comité de tesis y por sus consejos y pláticas muy amenas.

A las doctoras Myriam Elías e Isela Quintero por formar parte del comité de esta tesis y por su apoyo en el transcurso de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio que se convirtieron en entrañables amistades: Laura por las interminables pláticas, la motivación y los cafés, Guillermo por tus ocurrencias y tu serenidad que a veces es necesaria en la vida, Hiram por haber sido inseparable y por ser mi compañía en las aventuras que anduvimos pasando casi al otro lado del mundo, Héctor Arocha por haberme salvado con tu ayuda más de una vez y por todas las comidas y las pláticas.

A todos los alumnos de servicio social que han pasado por el laboratorio y que de una u otra forma han contribuido con el proyecto.

Al CONACYT por proporcionarme el financiamiento mediante la beca del doctorado con el número 573009.

A la tía Letty Olivares por creer en mí y darme su valioso apoyo cuando salí al extranjero.

DEDICATORIA

A mis padres Patricia Pérez y Víctor Vargas, por su incondicional apoyo y motivación para cumplir mis metas. Gracias por ser los pilares de mi vida y tener siempre la paciencia y comprensión en los momentos que estuve ausente para ustedes.

A Víctor Millán por ser esa pieza que me complementa, siendo parte de mi vida en esta etapa y de las etapas venideras. Por siempre motivarme cuando tenía momentos de fracaso y frustración.

A mis amigos incondicionales Rocío, Fany, Carlos, Ivan, Tomy y Santino por darle a mi vida la alegría con sus ocurrencias y brindarme su incondicional amistad.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO DEL TRABAJO	15
ANTECEDENTES	16
1. Biocombustibles	16
1.1. Definición y tipos de biocombustibles.....	16
1.2. Importancia del biocombustible.	16
1.3. Situación de los biocombustibles en México.....	17
2.Biocombustibles a partir de microalgas.....	17
2.1. Tipos de lípidos producidos por microalgas.....	18
2.2. Proceso de producción de biodiesel	20
2.3 Condiciones que propician el incremento en la producción de lípidos en las microalgas.....	21
2.3.1 Limitación de nutrientes.	22
2.3.2 Intensidad lumínica y temperatura	23
2.4. <i>Neochloris oleoabundans</i>.....	24
2.5. Problemática en procesos de extracción de lípidos de microalgas.....	25
2.6. Pared celular de microalgas.....	26

2.7. Disrupción celular y extracción de lípidos de microalgas	27
2.7.1. Métodos físicos.....	27
2.7.2. Métodos no-mecánicos	28
3. Técnicas para analizar el contenido lipídico.	29
4. Péptido melitina	30
CAPÍTULO 1.....	32
RESUMEN	32
INTRODUCCIÓN.....	33
MATERIAL Y MÉTODOS	34
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO 2.....	44
RESUMEN	44
INTRODUCCIÓN.....	45
MATERIAL Y MÉTODOS	47
RESULTADOS	54
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	75
PERSPECTIVAS	77
BIBLIOGRAFÍA	78
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	92
ANEXOS	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aceite producido por diferentes cultivos. (Chisti 2007)	18
Tabla 2. Valores de presión crítica (π_c) para la interacción de la melitina con las monocapas preformadas de los galactolípidos MGDG y DGDG.....	41
Tabla 3. Composición del medio de cultivo Bristol.	48
Tabla 4. Composición del medio Bristol modificado deficiente de nitratos y fosfatos. ..	48
Tabla 5. Composición del medio Bristol modificado exceso de nitratos y fosfatos.....	48
Tabla 6. Condiciones de cultivo a las que se aplicó el pretratamiento del péptido melitina.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso integrado de producción de biodiesel y bioetanol a partir de microalgas. (Garibay et al. 2009)	20
Figura 2. Sistemas para producción de microalgas.	21
Figura 3. Cinética de adsorción interfacial de melitina.	37
Figura 4. Cinéticas de inserción de la melitina en monocapas preformadas de MGDG y DGDG	38
Figura 5. Cinéticas de inserción de la melitina en monocapas preformadas de MGDG/DGDG (2:1 p/p)	39
Figura 6. Incremento en la presión superficial (D_p) producido tras la inyección de melitina vs la presión inicial (π_i) de las monocapas de MGDG, DGDG ó MGDG:DGDG.	40
Figura 7. Representación del fotobiorreactor tipo "air-lift".	47
Figura 8. Crecimiento de la microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> en fotobiorreactores tipo air-lift.....	54
Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia del tratamiento con melitina 10 μ g/ml sobre la microalga <i>N. oleoabundans</i> cultivada a 25°C y diferentes concentraciones de nutrientes.	55
Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia del tratamiento con melitina 10 μ g/ml sobre la microalga <i>N. oleoabundans</i> cultivada a 32°C y diferentes concentraciones de nutrientes	56
Figura 11. Espectros de emisión de fluorescencia del pellet y sobrenadante de la microalga <i>N. oleoabundans</i> cultivada a 25°C; bajo el tratamiento de melitina 10 g/ml. A: SB-N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: SN- N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: SA-N 14.71mM, P 6.42mM	58
Figura 12. Espectros de emisión de fluorescencia del pellet y sobrenadante de la microalga <i>N. oleoabundans</i> cultivada a 32°C; bajo el tratamiento de melitina 10 μ g/ml. A: SB-N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: SN- N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: SA-N 14.71mM, P 6.42mM	59

Figura 13. Representación del efecto de la melitina sobre la liberación de lípidos de la microalga <i>N. oleoabundans</i> cultivada a 1. 25°C y 2. 32°C y diferentes concentraciones de nutrientes	60
Figura 14. Correlación lineal entre diferentes concentraciones del estándar de lípidos trioleína y la intensidad de fluorescencia máxima en torno a 580nm obtenida mediante la técnica del Rojo Nilo	61
Figura 15. Representación cuantitativa del efecto de la melitina sobre la liberación de lípidos de la microalga <i>N. oleoabundans</i> cultivada a 1. 25°C y 2. 32°C y diferentes concentraciones de nutrientes.....	62
Figura 16. Efecto del tratamiento de melitina 10 µg /ml sobre el porcentaje de disrupción celular de la microalga <i>N. oleoabundans</i> cultivada a 25°C y 32° y diferentes concentraciones de nutrientes.....	63
Figura 17. Efecto de melitina 10 µg/ml en la extracción de lípidos neutros de la microalga <i>N. oleoabundans</i>	64
Figura 18. Microscopia electrónica de barrido de <i>N. oleoabundans</i> en prescencia y ausencia del tratamiento con el péptido melitina.....	65
Figura 19. Estudio del contenido lipídico de la microalga <i>N. oleoabundans</i> Microscopia de campo claro, microscopia de fluorescencia y microscopia confocal	67

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
MGDG	monogalactosil-diacilglicerol
DGDG	digalactosil-diacilglicerol
mN/m	Micronewton por metro
π_c	Presión crítica
π_i	Presión inicial
mL	Mililitros
L	Litros
IF	Intensidad de fluorescencia
μ L	Microlitros
OD	Densidad óptica
Rpm	Revoluciones por minute
UV-VIS	Ultravioleta-visible
FBR	Fotobiorreactores
°C	Grados centígrados
u.a.	Unidades arbitrarias

RESUMEN

La pared celular de las microalgas es una barrera necesaria para su supervivencia en entornos acuáticos. Desafortunadamente, esta barrera afecta ciertos procesos de interés biotecnológico como la extracción de aceites, por lo tanto, el proceso de recuperación de lípidos es un proceso crítico. El principal componente de la membrana de los cloroplastos en las plantas superiores y en las algas verde-azules son los galactolípidos, de los cuales el monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) y el digalactosil-diacilglicerol (DGDG) son los más predominantes específicamente. En esta investigación, se empleó la técnica de Langmuir para preparar monocapas de MGDG, DGDG y MGDG:DGDG 2:1 (p/p) y al evaluar la capacidad del péptido lítico melitina de insertarse y perturbarlas, los resultados mostraron que la melitina tiene la propiedad intrínseca de interactuar y perturbar monocapas interfaciales que simulen la pared celular de las microalgas, por lo tanto, se puede proponer a este péptido como un pretratamiento biológico alternativo a los actualmente reportados para la extracción eficiente de aceites. A partir de la dosis mínima del péptido con la cual se presentó dicho efecto, se analizó la actividad lítica del tratamiento con la melitina sobre la microalga *N. oleoabundans* obteniendo un incremento en la cantidad de lípidos extraídos mediante el rompimiento celular mostrándose un incremento del doble en el % w/w de lípidos con respecto al control. Afirmando que la melitina tiene un efecto de disrupción celular sobre la microalga empleada en esta investigación.

ABSTRACT

The cell wall of the microalgae is a necessary barrier for its survival in aquatic environments. Unfortunately, this barrier affects certain processes of biotechnological interest such as oil extraction, therefore, the process of lipid recovery is a critical process. The main component of chloroplast membranes in higher plants and in blue-green algae are galactolipids, of which monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG) and digalactosyl-diacylglycerol (DGDG) are the most predominant specifically. In this investigation, the Langmuir technique was used to prepare monolayers of MGDG, DGDG and MGDG: DGDG 2: 1 (w / w) and when evaluating the ability of melittin lytic peptide to insert and disturb them, the results showed that melittin has the intrinsic property of interacting and disturbing interfacial monolayers that simulate the cell wall of microalgae, therefore, can be proposed to this peptide as an alternative biological pretreatment to those currently reported for the efficient extraction of oils. From the minimum dose of the peptide with which this effect was presented, the lytic activity of the treatment with melittin was analyzed on the microalga *N. oleoabundans* obtaining an increase in the amount of lipids extracted by the cellular breakup showing an increase of two-fold % w / w with respect to the control. Affirming that melittin has a cellular disruption effect on the microalgae used in this investigation

INTRODUCCIÓN

Las microalgas se han convertido en una de las alternativas más prometedoras para la problemática actual de los biocombustibles, esto es debido a que acumulan en sus células, grandes proporciones de lípidos y generan altos rendimientos de biomasa. A diferencia de los cultivos vegetales productores de aceites biocombustibles, estos microorganismos se pueden cultivar en pequeños espacios de tierras no-agrícolas, ya sea en agua dulce o salada y con mínimos requerimientos nutricionales para crecer (Nigam y Shing 2011). Una de las principales limitantes para la competitividad económica de los biocombustibles a partir de microalgas es la incapacidad de sus células para excretar los lípidos que típicamente se encuentran encapsulados dentro de gránulos intracelulares, motivo por el cual la tecnología utilizada deberá implicar el rompimiento de las estructuras de membrana y pared celular para la liberación del producto de interés, dicha etapa reviste uno de los eventos más críticos y costosos del proceso, lo cual le impide competir exitosamente en el mercado con los demás tipos de combustibles.

Los métodos convencionales de recuperación de lípidos son métodos físicos, químicos y biológicos (Zhu et al. 2017). Sin embargo, todos estos métodos son costosos, poco eficientes y requieren de mucha energía, lo cual hacen que el proceso de producción de biodiesel con las microalgas como materia prima no sea factible. Como un método alternativo se propone la melitina, la cual es el principal componente activo del veneno de la abeja, un péptido lítico ampliamente estudiado para el seguimiento de los mecanismos de formación de poros e interacciones lípido-proteína en las membranas, posee una alta actividad antiviral y antimicrobiana, además de propiedades citotóxicas sobre células de mamíferos. (Asthana et al. 2004; Hyun-Ji et al. 2013; Khatun y Mukhopadhyay 2013). A pesar de que se ha reportado la actividad del péptido contra diversos tipos de células, aún no se tienen reportes del efecto de este en las microalgas, por lo tanto, con esta investigación se pretendía evaluar el efecto lítico del péptido melitina sobre la cantidad de lípidos neutros recuperados de la microalga *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185 bajo diferentes condiciones de cultivo que fueron concentración de nitratos y fosfatos y temperatura.

JUSTIFICACIÓN

En el proceso de producción de biocombustibles de tercera generación, la recuperación de los lípidos es un proceso crítico debido a que representa de un 20 a 75 % del costo total de producción, esto es debido a que la pared celular imposibilita la recuperación de dichos lípidos. Una alternativa para esta problemática es el uso de un método de disrupción celular. Existen distintos métodos para alterar o romper la pared celular de las microalgas, pero todas estas requieren de energía adicional o son muy costosas. La melitina es un péptido altamente lítico para cualquier tipo de célula, sin embargo, no se había reportado su efecto en microalgas; el costo del péptido es relativamente bajo, por lo tanto, cumple la función de un pretratamiento para mejorar la eficiencia de la difusión del solvente al interior de la célula.

HIPÓTESIS

El pretratamiento de disrupción celular mediante el péptido lítico melitina mejora el rendimiento del proceso de extracción de lípidos de cultivos de microalgas de la cepa *Neochloris oleoabundans*.

OBJETIVO DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL:

Potenciar la extracción de lípidos de la microalga *Neochloris oleoabundans* mediante el rompimiento celular con el péptido melitina.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Preparar monocapas que simulen la pared celular de las microalgas y analizar la capacidad de la melitina para insertarse en ellas.
- ❖ Cultivar la cepa *Neochloris oleoabundans* bajo diferentes condiciones nutrimentales.
- ❖ Evaluar el efecto del pretratamiento sobre la microalga *Neochloris oleoabundans* aplicando la concentración máxima de melitina obtenida de la capacidad de la melitina para insertarse en las monocapas.
- ❖ Comparar el posible incremento lipídico en la extracción por solventes en ausencia y presencia del pretratamiento.
- ❖ Corroborar el efecto a nivel celular de la melitina como método de disrupción celular sobre la microalga *Neochloris oleoabundans*.

ANTECEDENTES

1. Biocombustibles

1.1. Definición y tipos de biocombustibles

El término biocombustible es referido a los combustibles sólidos, líquidos o gaseosos que son producidos por fuentes renovables. La gran diferencia entre los biocombustibles y los combustibles de petróleo es el contenido de oxígeno; además de que los primeros no son contaminantes, son sustentables y son confiables para obtener de fuentes o recursos renovables. Existe una clasificación de los biocombustibles de acuerdo con la fuente donde son obtenidos, la primera categoría la componen los biocombustibles de primera generación, los cuales son realizados de fuentes vegetales que son usadas para alimento, por ejemplo, cultivos de caña de azúcar y aceites vegetales. La segunda categoría la conforman los biocombustibles de segunda generación, en donde los biocombustibles se obtienen de cultivos no destinados para la industria alimenticia. Finalmente, los combustibles de tercera generación, en los cuales la fuente de materia prima son las microalgas. La viabilidad de los biocombustibles depende en gran parte del cultivo a partir del cual provienen y la tecnología a partir de la cual se obtuvieron. Por ejemplo, los obtenidos a partir de biomasa renovable: aceites vegetales (de girasol, colza, soja o palma), aceites usados (de fritura) (Zhang 2003), grasas animales y aceites de microalgas (Fernández et al. 2012).

1.2. Importancia del biocombustible.

Desde el inicio del siglo XXI los biocombustibles han adquirido interés a nivel mundial, la crisis de los recursos petrolíferos ha sido el motor para la búsqueda de nuevas fuentes de energía, en este contexto se desarrolló el biodiesel como un biocombustible alternativo. Una de las principales razones para desarrollar los biocombustibles es el obtener una mayor seguridad energética, lo que significa una disminución de las importaciones de combustibles fósiles y ahorro en divisas esto es debido a que a medida que el precio del petróleo incrementa, los biocombustibles son más competitivos. (Sims et al. 2006) Los

biocombustibles líquidos son importantes para el futuro porque tienen la capacidad de remplazar a los combustibles fósiles.

1.3. Situación de los biocombustibles en México.

La respuesta de México a la era de los biocombustibles es un tanto tardía, su participación responde prioritariamente a las tendencias internacionales más que a una propia política nacional, esta participación se inicia apenas en el 2007 con la aprobación de la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (DOF 2008), la política de esta ley es parte de la estrategia nacional para reducir la emisión de GEI y al problema de financiación para la producción de petróleo aunado a la baja en sus reservas nacionales, tiene como objetivo promover la producción de insumos para bioenergéticos a partir de las actividades agropecuarias, forestales, algas, procesos biotecnológicos y enzimáticos del campo mexicano, por lo tanto, el desarrollar nuevas tecnologías o mejorar las existentes es una gran oportunidad la investigación.

2. Biocombustibles a partir de microalgas

Los biocombustibles de tercera generación son llamados también biocombustibles avanzados debido a las materias primas y a los procesos tecnológicos utilizados para su producción, la materia prima de los combustibles de tercera generación son las microalgas. Estas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariotas (cianobacterias) y eucariotas, capaces de convertir la energía solar en energía química a través de la fotosíntesis, estas se localizan en diversos ambientes bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Amaya y Sarmiento 2010). Estos microorganismos prometen una gran producción de biodiesel por unidad de área debido a su alto contenido de lípidos, el cual supera a todas las fuentes de biodiesel utilizadas en la actualidad (Tabla 1). En contraste con otras fuentes de materia prima para la producción de biocombustibles, los biocombustibles a base de microalgas tienen numerosas ventajas, entre las que destaca que estos biocombustibles de tercera generación no tienen un impacto en el suministro de alimentos, al contrario de la primera generación de fuentes biocombustibles de aceite comestible como la soya, la palma y canola (Ramluckan et al. 2014). Además de que pueden ser cultivadas en cualquier tierra

disponible, agua o solución salina, incluso en agua residual de manera que no afecta el uso del suelo para otros propósitos mientras que fuentes no comestibles de segunda generación, como la *jatropha*, requieren grandes cantidades de tierra cultivable (Ramluckan et al. 2014), y su cultivo no requiere el uso de herbicidas o pesticidas (Peñarranda et al. 2013). La biotecnología de microalgas se inicia formalmente cuando en los años 50, científicos alemanes comenzaron a cultivar microalgas en forma masiva para obtener lípidos y proteínas, reemplazando a las proteínas animal y vegetal convencionales para consumo directo del ganado y del hombre. Durante el periodo 1955-1970 se realizaron avances en la tecnología del cultivo de algas y se ampliaron los objetivos de su utilización (Belay 1997). Desde el año 2008 los investigadores en la Swinburne University of Technology en Sarawak, Malasia, extrajeron lípidos (aceites) de microalgas del género *Chlorella*, que fueron usados como precursores para la producción de biocombustibles (Swinburne Sarawak Research & Consultancy Office, 2010).

Tabla 1. Aceite producido por diferentes cultivos. (Chisti 2007)

Especie	Aceite producido (gal/Ha.año)
Microalgas	2000-8000
Palma de aceite	256
Coco	116
Jatropha	83
Canola	51
Maní	45
Girasol	41
Cárcamo	33
Soya	19
Maíz	7

2.1. Tipos de lípidos producidos por microalgas.

Debido a que los lípidos son el componente de las microalgas de donde se produce el biocombustible, es de gran importancia conocer la naturaleza de estos. Los ácidos grasos consisten en un grupo carboxílico hidrofílico unido a una cadena hidrofóbica de hidrocarburos, debido a esta dualidad se les clasifica como anfipáticos. Los ácidos grasos son constituyentes de moléculas lipídicas y se les denomina en base a sus dos importantes

características que son: número total de átomos de carbono y el tipo de enlace (doble o sencillo) en su cadena. Los ácidos grasos saturados son de enlace sencillo, mientras que los insaturados son de enlace doble. Cuando el extremo carboxilo de la molécula de ácido graso se une a una cabeza polar sin carga, se forma un lípido neutro. Por otro lado, cuando la asociación de dicho extremo se une a un grupo con carga, se forma una molécula de lípido polar. Los lípidos se pueden definir como moléculas biológicas que son solubles en solventes orgánicos y la mayoría de ellos contienen ácidos grasos. Dichos lípidos se pueden clasificar en dos categorías basadas en la polaridad del grupo que está en la cabeza, las cuales son: lípidos neutros que son los acilgliceroles y ácidos grasos libres, y lípidos polares que se subcategorizan en fosfolípidos y glicolípidos (Halim et al. 2012).

Los lípidos neutros en las células de las microalgas son usados principalmente como almacenamiento de energía, mientras que los lípidos polares forman la bicapa de la membrana. Los acilgliceroles consisten en ácidos grasos unidos por un enlace éster a un glicerol y son categorizados de acuerdo con su número de ácidos grasos en triacilglicéridos, diacilglicéridos y monos acilglicéridos.

En las microalgas, los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glucolípidos y fosfolípidos. La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable. Los ácidos grasos que van desde C16 a C18 son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (C10, C12, C14) o moléculas demasiado largas (> C20) predominan en algunas especies (HU Qiang et al. 2008). La composición del perfil de ácidos grasos extraídos por las diferentes especies de microalgas es afectada por el ciclo de vida de la especie, así como sus condiciones de cultivo, composición del medio, temperatura, intensidad lumínica. Por ejemplo, las microalgas cultivadas durante su fase estacionaria tienen menos lípidos polares comparado con los lípidos obtenidos durante la fase logarítmica (Halim et al. 2012)

2.2. Proceso de producción de biodiesel

El proceso de producción de biodiesel está conformado en términos generales por las etapas de cultivo de microalgas, cosecha, secado, extracción lipídica y transesterificación (Figura 1). Las microalgas pueden cultivarse de dos maneras: de forma abierta o en sistemas cerrados. Los cultivos abiertos comprenden sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito ‘Raceway ponds’, en este tipo de sistemas, las microalgas crecen en el entorno en donde los parámetros de cultivo (temperatura y la intensidad de la luz) dependen de las condiciones meteorológicas, las microalgas cultivadas en un sistema de este tipo a menudo sufren de tasas de crecimiento imprecisas y son más susceptibles a la contaminación por la invasión de especies locales (Figura 2).

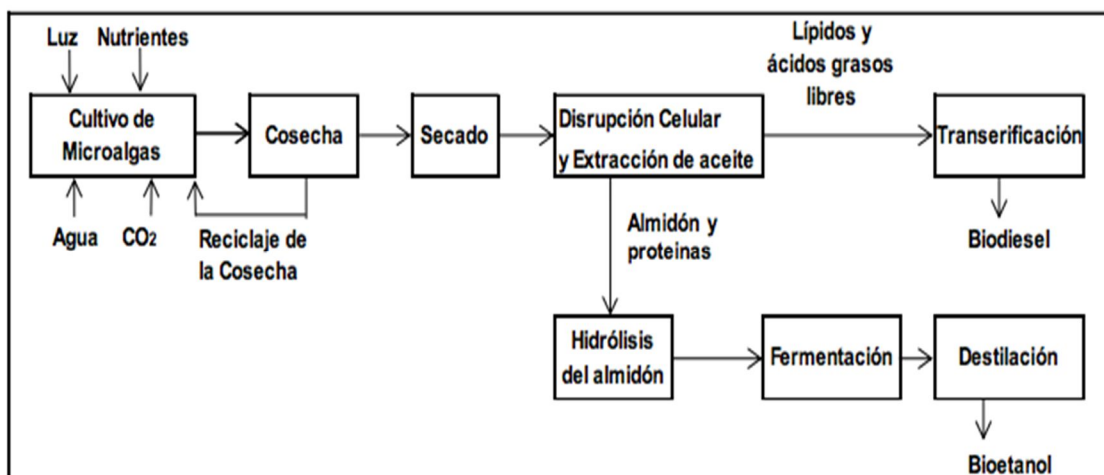


Figura 1. Proceso integrado de producción de biodiesel y bioetanol a partir de microalgas. (Garibay et al. 2009)



Figura 2. Sistemas para producción de microalgas. (a) Sistema tipo ‘circuito’: tipo de sistema con paletas giratorias para la circulación del agua. (b) Fotobiorreactor tubular.

En lo que respecta al cultivo de microalgas en sistemas cerrados se pueden tener las condiciones de cultivo controladas, además la ventaja de que estos sistemas proporcionan protección contra la contaminación o invasión de especies locales, a pesar de esto, los sistemas cerrados no son preferidos por el inconveniente de su alto costo de operación (Halim et al. 2012).

2.3 Condiciones que propician el incremento en la producción de lípidos en las microalgas.

El medio de cultivo para las microalgas debe contener todos los elementos constituyentes de la célula como lo son el nitrógeno (N), el fósforo (P), el hierro (Fe) y algunos metales traza (Berberoglu et al. 2009), sin embargo, para la producción de biodiesel a partir de microalgas es también importante considerar que se puede optimizar el proceso mediante un aumento en la cantidad de la producción de lípidos ya que estas responden a estímulos estresantes.

2.3.1 Limitación de nutrientes.

El crecimiento de las microalgas y la composición lipídica son afectados por la disponibilidad de nutrientes, el caso comúnmente reportado es el déficit de nutrientes (Lin et al. 2012), esto es debido a que bajo dichas condiciones la tasa de división celular es reducida pero la biosíntesis de ácidos grasos se mantiene en ciertas especies siempre y cuando se tenga suficiente luz y CO₂ para que se realice la fotosíntesis.

Bajo condiciones normales de cultivo las microalgas presentan un contenido de lípidos que varía entre el 20 y 50% de su peso seco, sin embargo, cuando se someten a situaciones de estrés, frecuentemente incrementan su fracción lipídica. Aun cuando bajo condiciones de estrés algunas microalgas pueden alcanzar contenidos de lípidos superiores al 40 %, la calidad del biodiesel es considerablemente afectada por la composición de los ácidos grasos de los lípidos (Knothe 2008). Se ha reportado en estudios de determinaciones lipídicas de especies como *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Resultando más productiva la cepa *Chlorella* sp. con un valor máximo de 37% PS para los estímulos estresantes aplicados que fueron déficit de nitrógeno e incremento de fierro, este valor es seguido por la cepa de *Scenedesmus* sp. con 18%. (Junda et al. 2012). Al usar aire enriquecido con CO₂ en valores cercanos al 2% la cantidad de lípidos que puede producir microalgas como *Scenedesmus*, *Chlorella* o *Nannochloropsis* pueden incrementarse hasta 12, 8 ó 5 veces, respectivamente (Chen et al. 2011). Al igual que el nitrógeno, hay reportes de mayores acumulaciones de lípidos con una limitación de fósforo (Dean et al. 2010).

El nitrógeno es el macronutriente más importante para las microalgas, este influye en el metabolismo lipídico y en el crecimiento (Sharma et al. 2012). Mientras que el fósforo influye significativamente en la transferencia de energía y la transducción de señales mediadas en los procesos metabólicos celulares, fotosíntesis y respiración. La limitación de fósforo causa defectos en la división celular además perjudica la síntesis de fosfolípidos, lo cual promueve la síntesis de triacilglicéridos (Deng et al. 2011)

2.3.2 Intensidad lumínica y temperatura

La luz es un factor elemental para la sobrevivencia y crecimiento de organismos autótrofos. En el caso particular de las microalgas, pueden crecer bajo diferentes intensidades de luz y muestran alteraciones notables en su composición y fotosíntesis debido a este factor (Hu et al. 2008). El metabolismo lipídico es modulado bajo la influencia de las diferentes intensidades de luz, esto conduce a una alteración del perfil lipídico. A intensidades de luz bajas se induce la generación de lípidos polares de membrana unidos al cloroplasto, mientras que a intensidades de luz altas el contenido total de lípidos polares decrece con un incremento en los lípidos neutros, principalmente triacilglicéridos (Sharma et al. 2012). Tal es el caso de *Chlorella* sp. y *Monoraphidium* sp. en donde se aplicaron altas intensidades lumínicas y se incrementó tres veces la cantidad de lípidos comparado con intensidad de luz baja (He et al. 2015).

Además de la intensidad lumínica, otro factor importante en lo que respecta a la luz son los ciclos de luz y oscuridad, los cuales se les llama fotoperiodos, tal es el caso de *Dunaliella viridis* en la cual con un fotoperiodo de luz y oscuridad se incrementó el contenido total de lípidos (Gordillo et al. 1998).

En lo que respecta a la temperatura, las microalgas tienen la capacidad de sobrevivir y crecer en un amplio rango de temperaturas, desde 15°C a 40°C. Dicho factor tiene gran influencia en la composición de los ácidos grasos específicamente en la saturación de los lípidos de membrana, esto lo hace la célula para adaptarse a cambios en el ambiente debido al cambio de temperatura. En la mayoría de las especies de microalgas, la insaturación de los ácidos grasos incrementa cuando decrece la temperatura, entonces cuando se manejan altas temperaturas se incrementan las saturaciones de los ácidos grasos. Un estudio en donde se sometió a *Monoraphidium* sp. SB2 a un crecimiento con 32°C mostró un incremento en el contenido lipídico (L. F. Wu et al. 2013) lo cual puede confirmar lo anteriormente mencionado.

2.4. *Neochloris oleoabundans*

Neochloris oleoabundans también conocida como *Ettlia oleoabundans* es una clorofita oleaginosa de agua dulce perteneciente a la clase *Chlorophyceae* y a la familia *Chlorococcaceae*. Fue aislada por primera vez del desierto en Arabia Saudita de un ambiente árido en donde el acceso al agua es siempre un reto. En términos de formas de crecimiento, esta microalga tiene la capacidad de crecer bajo condiciones fototróficas, heterotróficas o mixotróficas (Morales-Sánchez et al. 2014).

La reproducción de esta microalga es llevada a cabo mediante zoosporas (da Silva et al. 2009). Su forma celular es generalmente esférica y mide de 3-4 μm de diámetro, pero esto puede cambiar de acuerdo a las condiciones de cultivo o la fase de crecimiento (Baldisserotto et al. 2014; Giovanardi et al. 2014). (Davis et al. 2012) indica que el tamaño promedio del diámetro celular incrementa a 5.2 μm cuando se utilizan concentraciones bajas de nitratos en el medio de cultivo.

Hay muchas evidencias del valor nutricional de esta especie para su empleo en acuicultura. Sin embargo, el reciente interés que ha adquirido esta especie se relaciona con la obtención de bioenergía, concretamente de biodiesel, y se debe a su capacidad para almacenar elevadas cantidades de aceite. En condiciones estándar de crecimiento, *N. oleoabundans* contiene alrededor de 30% de lípidos respecto a su peso seco. No obstante, bajo determinadas condiciones de cultivo puede llegar a acumular hasta un 54% de lípidos en su citoplasma, de los que el 80% están como triglicéridos (Tornabene et al. 1983). Por otro lado, *N. oleoabundans* muestra un elevado contenido en ácidos grasos saturados de 16–20 carbonos en su perfil lipídico, tal como es requerido para la conversión a biodiesel, lo que la convierte en una de las especies de microalgas más adecuadas para este fin.

La privación de nitrógeno en el medio es la condición de estrés más común en todas las especies de microalgas, incluida *N. oleoabundans* (Baldisserotto et al. 2014), sin embargo, la luz también es uno de los factores limitantes más importantes para el cultivo de microalgas. A pesar de que estas se adaptan a diferentes intensidades, se ha reportado que se recomienda una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para esta microalga (X. Sun et al. 2014). Además de los nutrientes y la intensidad lumínica, otro factor importante es la temperatura, de hecho, se menciona por (Y. Yang et al. 2013) que la temperatura es un factor más significativo en comparación a la intensidad lumínica para esta microalga, ya

que la temperatura afecta a en el consumo de nutrientes, ósea la microalga tiende a consumir más nitratos a altas temperaturas. En estudios anteriores realizados por (B. Wang y Lan 2011) se concluyó que un rango de 25-30° proveía un óptimo crecimiento.

2.5. Problemática en procesos de extracción de lípidos de microalgas.

La producción de biodiesel a partir de los lípidos extraídos de microalgas ha sido considerada como una prometedora y potencial fuente de combustible renovable que podría sustituir a los combustibles fósiles (Ramluckan et al. 2014). Sin embargo, este enfoque todavía no se comercializa debido a altos costos de los procesos que están asociados con el tiempo y/o secado intensivo de energía, y los procesos de extracción de lípidos (Taher Al-Zuhair et.al. 2014) debido a que las microalgas no secretan los lípidos producidos. Dicho proceso de recuperación de los lípidos es considerado uno de los más costosos, abarcando desde un 20-75 % del costo total de producir el biocombustible (Uduman et al. 2010), el cual en estudios anteriores se ha reportado que ronda los \$11.57 dólares por galón(A. Sun et al. 2011), lo cual no resulta ser competitivo con los combustibles basados en petróleo que ronda los \$ 3.00 dólares por galón (EIA, USA 2018).

El principal problema a la hora de realizar la extracción del aceite de las microalgas es el rompimiento de la pared celular, puesto que algunas especies como por ejemplo *Botryococcus braunii*, poseen una matriz celular compleja, otras como las diatomeas, poseen frústulas de hidratos de sílice, las cuales las protegen. Por tanto, la ruptura celular es particularmente compleja, debido a la diferencia que existe a nivel de composición de pared celular entre los diferentes géneros de microalgas (Richmond 2004). Pese a las dificultades que se puedan presentar, el método de disrupción celular es de gran importancia en la obtención de los productos intracelulares de los microorganismos, y es clave para aumentar la eficiencia en la extracción de lípidos, puesto que, al romper la estructura celular, más lípidos almacenados dentro de las células pueden ser liberados favoreciendo el contacto de estos con el solvente orgánico (Lee et al. 2009).

Hace algunos años se empezaron los estudios de la etapa de extracción del aceite de las microalgas para su posterior transformación en biodiesel (Chisti Y. 2007) debido a la

importancia de esta etapa en la eficiencia y los costos globales del proceso, los investigadores de varios países empezaron a evaluar los diferentes métodos en función de la composición de la pared celular de la microalga que se va a someter a extracción.

2.6.Pared celular de microalgas

Las microalgas guardan sus valiosos componentes dentro de la célula detrás de una resistente y gruesa pared celular, que para removerla es necesario el uso de tecnología que implica el uso de energía o pasos que incluyen el uso de solventes. Dicha barrera física se encuentra poco entendida aún debido a que existen grandes discrepancias en su estructura y/o composición entre las familias y géneros o especies debido a la gran diversidad de este tipo de microorganismo, ya sea su fenotipo o etapa del ciclo de vida (Baudefet et al. 2017). Existen diferentes reportes en donde mencionan la composición de la pared celular de las algas pertenecientes a la familia Chlorococcaceae en los cuales se menciona que dichas paredes son ricas en galactosa, glucosa y ramnosa, en algunas otras la manosa y glucosa son los carbohidratos principales y con significativas cantidades de glucosamina. (Blumreisinger et al. 1983).

La pared celular en la microalga *N. oleoabundans* según (Rashidi y Trindade 2018) está compuesta de carbohidratos en 24.3%, proteínas 31.5%, lípidos 22.2% y de 7.8% de material inorgánico, lo cual coincide con la pared celular de las plantas terrestres en donde los carbohidratos son el principal componente. Dentro del porcentaje de carbohidratos mencionado se encuentran polisacáridos compuestos esencialmente de ramnosa, galactosa ácido glucurónico y glucosamina. En lo que respecta a la morfología celular, la pared celular tiene un grosor de aproximadamente 200 nm y consiste en dos capas y una de ellas es posiblemente rica en carbohidratos. La información con la que se cuenta actualmente resulta de mucha utilidad para entender la complejidad de la pared celular y cómo influye en el proceso de la obtención de sus contenidos intracelulares.

2.7. Disrupción celular y extracción de lípidos de microalgas

Hay varias formas en que disrupción se puede lograr, con base en la acción mecánica, como homogeneizadores, molinos de grano y ultrasonidos, o la acción no mecánica, por ejemplo, congelación, hidrólisis y shock osmótico, pero como ya se ha mencionado, todas estas formas implican dificultades técnicas o económicas.

2.7.1. Métodos físicos

La destrucción mecánica como herramienta de extracción de componentes de microalgas, abarca varias clases de dispositivos mecánicos como homogeneizadores celulares, molinos de bolas, sistemas de prensado (Lee et al. 2009). En un estudio se evaluaron varios sistemas de destrucción mecánica para la extracción de lípidos de la microalga *Botryococcus braunii* concluyendo que el mayor porcentaje de extracción de aceite se obtuvo al utilizar un molino de bolas con esferas cristal de 1 mm. durante un minuto. A pesar de que la disrupción mecánica generalmente provee altos rendimientos de recuperación con un buen control y escalabilidad, poseen la desventaja de la dificultad para la recuperación del aceite extraído, adicionalmente, al ser una técnica que destruye mediante impactos la pared celular, libera además de los lípidos, otras sustancias presentes dentro de la célula, todo esto hace que esta clase de métodos sean utilizados en combinación con métodos de solventes químicos.

El método de extracción más común ha sido por muchos años el método de solventes químicos para obtener lípidos de células animales y vegetales; este método también se utiliza para la extracción de lípidos de microalgas, una gran variedad de solventes orgánicos suelen ser utilizados en la extracción de aceite de microalgas, siendo los más populares el hexano y el etanol, mediante una mezcla hexano-etanol, es posible extraer más del 98% de los ácidos grasos presentes en la biomasa (Richmond et al. 2004), sin embargo, al ser el etanol un buen solvente de extracción, su selectividad hacia los lípidos es relativamente baja comparada con otros solventes, por lo que en extracciones con etanol, pueden aparecer otros componentes de las microalgas como azúcares, pigmentos o aminoácidos.

2.7.2. Métodos no-mecánicos

En este tipo de disrupción se utilizan métodos basados en materiales químicos o biológicos que interactúan con la pared celular o la membrana para dejar pasar los componentes intracelulares en el medio (Dong et al. 2016). Estos métodos aparentemente no necesitan de un consumo de energía excesiva como los mecánicos, sin embargo, el efecto de estos métodos tiene relación entre la dosis y el tipo de materiales, lo cual pudiera generar un impacto económico.

En la disrupción química varios materiales han sido probados como ácidos, solventes, sales, nanopartículas y surfactantes. La selectividad, sustentabilidad y la eficiencia de estos compuestos dependerá totalmente de la estructura y composición de la pared celular de la microalga (Lee et al. 2017).

La disrupción celular también puede llevarse a cabo por métodos biológicos, los cuales involucran lisis enzimáticas o tratamientos alguicidas. Las ventajas de estas técnicas es que tienen especificidad, condiciones de operación suaves y bajo consumo de energía (Günerken et al. 2015). En la extracción enzimática se degrada la pared celular de las microalgas mediante el empleo de enzimas, esto facilita la salida de los aceites presentes en la célula para su posterior transformación en biodiesel, estas enzimas, también pueden ser utilizadas para transformar los ácidos grasos presentes en las microalgas, en lípidos aptos para su posterior transesterificación (Ward y Singh 2005). , sin embargo, la actividad enzimática se ve afectada por muchas variables como la naturaleza de la enzima, las concentraciones y las razones de los reactantes, la composición de los aceites o mezclas de ácidos grasos, la composición de la pared celular, el contenido inicial de agua, la temperatura, entre otros (Robles et al. 1998). Entre las enzimas líticas previamente probadas se encuentra la celulasa, lipasa y proteasa (Ravanal et al. 2016; Sierra et al. 2017; D. Wang et al. 2015; Zheng et al. 2016) además de combinaciones con los métodos mecánicos. Aunque aparentemente los métodos enzimáticos son considerados como los que consumen menos energía y amigables con el ambiente, el reto está en la implementación del escalamiento y los tiempos de respuesta, el costo, la estabilidad y el re-uso (Günerken et al. 2015).

Se ha reportado también el uso de péptidos algicidas para causar disrupción celular , en uno de ellos el motivo del estudio fue evaluar la toxicidad de *Bacillus cereus* (Kataev et al. 2012). Ellos propusieron un posible mecanismo de acción en el que las toxinas peptídicas efectúan la lisis celular. Primero, la toxina peptídica cuando está en forma de monómero penetra la envoltura celular de la microalga y se incorpora a la membrana plasmática. Después, los monómeros son oligomerizados en estructuras formadoras de poros. Posteriormente ocurre una permeabilidad selectiva de iones calcio causando una reducción de la resistencia de la membrana plasmática. Finalmente, la formación del poro conduce a la perturbación de la homeostasis y eso lleva a la muerte celular y lisis.

Otros reportes de efecto alguicida proveniente de derivados de péptidos, son los realizados por (S. C. Park et al. 2011)(S.-C. Park et al. 2008) en donde por medio del péptido α -helicoidal HP y sus análogos HPA3 y HPR3NT3. Se observó un efecto de reducción en la movilidad de las algas, la disrupción de su membrana plasmática y la liberación de los componentes intracelulares. Ellos proponen el mecanismo en el cual el péptido actúa sobre la célula mediante formación de poros, lisando la membrana. El carácter anfipático del péptido deriva en permitir que las moléculas actúen en la membrana por una actividad permeante, y así puedan unirse fácilmente a la membrana plasmática e insertarse en la bicapa lipídica.

3. Técnicas para analizar el contenido lipídico.

El análisis tradicional del contenido de lípidos en muestras biológicas se ha realizado por extracción con disolvente y determinación gravimétrica (Bligh y Dyer, 1959). Un análisis más detallado y caracterización se realiza por GC o HPLC (Carvalho y Malcata 2005 y Wiltshire et al., 2000). Una desventaja de estas técnicas, en términos de selección de alto rendimiento y la medición en el momento, es que los pasos necesarios para tanto del extracto como derivatizar los ácidos grasos para el análisis de GC son numerosas y consume mucho tiempo. Por otra parte, las cantidades adecuadas de biomasa deben ser cultivadas para la extracción y derivatización (aproximadamente 10-15 mg de peso húmedo de células (Akoto et al. 2005). La cantidad de muestra y el tiempo de preparación, sin embargo, pueden reducirse en gran medida si el contenido de lípidos de las células de

algas se mide in situ. La técnica debe ser aplicable al cultivo en biorreactores en miniatura y uso de microsondas basados en fluorescencia (Harms et al. 2002 y Kostov et al. 2001). La medición de lípidos se ha realizado previamente usando Rojo Nilo, una sonda fluorescente soluble en lípidos que posee varias características ventajosas en la medición in situ. Es relativamente fotoestable, intensamente fluorescente en disolventes orgánicos y entornos hidrófobos, pero tiene un rendimiento cuántico bajo en agua (Fowler et al. 1979). El máximo de emisión de Rojo Nilo está desplazado al azul como la polaridad del medio ambiente circundante disminuye, (Cooksey et al. 1987, Greenspan y Fowler, 1985, Laughton, 1986; Lee et al. 1998) lo que permite diferenciar entre los lípidos neutros de los lípidos polares dando por hecho la elección apropiada de las longitudes de onda de excitación y emisión.

4. Péptido melitina

Se pueden probar otras alternativas en el proceso de disrupción que puedan combatir la problemática del proceso de extracción, existen varias clases de moléculas como péptidos anfipáticos que pueden perturbar la permeabilidad de la membrana e inducir a que se elimine el material atrapado. (Liu y Regen 1993). La melitina es el principal componente de la abeja de la miel (*Apis mellifera*). Es un péptido lítico catiónico (Dempsey 1990), se identificó por primera vez como un factor lítico directo (Neumann et al. 1953), este péptido es uno de los más usados con propiedades de interacción lípidos- proteína a nivel molecular (Dempsey 1990). La molécula está compuesta por 26 residuos de aminoácidos seguidos por la secuencia: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂ (Habermann y Jentsch 1967), el tamaño pequeño y la fácil disponibilidad de la melitina hacen que sea un excelente péptido modelo para estudiar la interacción lípido-proteína.

El modo de acción del péptido melitina depende de la composición de la membrana; diferentes modelos de membrana se han utilizado para estudiar la interacción melitina-lípido (Ferre et al. 2009; Ningsih et al. 2012; Rapson et al. 2011). En agua, el péptido melitina puede existir como monómero o a altas concentraciones o alta fuerza iónica como tetrámero. En la forma monomérica la conformación es desordenada, mientras que en la forma de tetrámero predomina en α -hélice (Vogel y Jähnig 1986).

Es común que se crea que la formación de poros es un modo de acción producido naturalmente por péptidos como péptidos antimicrobianos y toxinas (Schwarz et al. 1992), bajo ciertas condiciones, la molécula de melitina se inserta en la bicapa lipídica y forma múltiples agregados que son controlados por la temperatura, pH, fuerza iónica, composición lipídica. Varios estudios mostraron que la melitina forma poros de diferentes tamaños y distribución, por ejemplo, en el rango de 10-60 Å (Rex 1996), 13–24 Å (Matsuzaki et al. 1997) y 25–30 Å (Ladokhin et al. 1997).

El péptido interactúa espontáneamente con membranas fosfolipídicas, a bajas concentraciones se une a las membranas como una α -hélice anfipática induciendo la formación de un poro, mientras que a altas concentraciones conduce a la extracción de lípidos por la formación de biselas solubles de lípido/péptido (Lafleur et al. 1987; Lafleur et al. 1991). El péptido melitina tiene un amplio espectro de actividad contra células eucariotas y procariotas (Jamasbi et al. 2014), puede atacar células vivas como glóbulos rojos y unirse a su membrana espontáneamente conduciendo a la disrupción celular y hemólisis. Se analizaron los efectos biológicos del péptido melitina sobre la microalga unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata*, con la finalidad de evaluar la toxicidad cuando se le da un uso terapéutico a dicho péptido. Mediante los resultados obtenidos encontraron a la melitina ejerciendo efecto un tóxico en la microalga bajo una dosis de 10 µg/ml, en la cual, se presentó un efecto tóxico de casi el 100% (Galdiero et al. 2015).

CAPÍTULO 1.

RESUMEN

La pared de las microalgas es una barrera necesaria para su supervivencia en entornos acuáticos. Desafortunadamente, esta barrera afecta ciertos procesos de interés biotecnológico como la extracción de aceites, por tanto, el empleo de péptidos líticos o enzimas capaces de degradar la pared celular de las microalgas son un paso crítico para el empleo eficiente de la biomasa. El principal componente de la membrana de los cloroplastos en las plantas superiores y en las algas verde-azules son los galactolípidos, de los cuales el monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) y el digalactosil-diacilglicerol (DGDG) son los más predominantes. En este capítulo se empleó la técnica de Langmuir para preparar monocapas de MGDG, DGDG y MGDG:DGDG 2:1 (p/p) que semejan la pared celular de las microalgas y al evaluar la capacidad del péptido lítico melitina de insertarse y perturbarlas. Los resultados mostraron que la melitina tiene la propiedad intrínseca de interactuar y perturbar monocapas interfaciales que simulen la pared celular de las microalgas, por lo tanto, se puede proponer a este péptido como un pretratamiento biológico alternativo a los actualmente reportados, para la extracción eficiente de aceites.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos que han adquirido un gran interés debido a que producen lípidos que fácilmente pueden ser convertidos a biocombustibles, sin embargo, la recuperación de estos lípidos requiere de una pared celular suficientemente permeable para permitirlo. Actualmente existen numerosos métodos para realizar disrupción celular en las microalgas y recuperar los lípidos, pero estos métodos generalmente requieren de energía y/o son costosos. Los métodos enzimáticos son una alternativa que requiere de poca energía y se han usado anteriormente en la industria para la degradación de material lignocelulósico y fermentar los azúcares a etanol, además también se han aplicado estos métodos enzimáticos para degradar estructuras celulares en microalgas sin ser totalmente eficientes.

El principal problema con la obtención de lípidos de microalgas es la complejidad de la pared celular y también la variabilidad de su composición entre las diferentes especies. Takeda y Hirokawa (1978) reportan que la pared celular de *C. ellipsoidea* contiene glucosamina, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y manosa. Los galactolípidos son el principal componente de membranas cloroplásticas y de membranas de algas verdes en general, siendo MGDG (monogalactosil -diacilglicerol) y DGDG (digalactosil-diacilglicerol) los predominantes.

Hasta la fecha, la melitina es uno de los péptidos antimicrobianos y citolíticos más estudiados. Es el principal componente del veneno de *Apis mellifera* y contiene 26 residuos de aminoácidos siendo mayormente hidrofóbico (1-20). Debido a su propiedad anfifílica, es soluble en agua y puede asociarse espontáneamente con membranas naturales y artificiales. En este capítulo se empleó la técnica de Langmuir para preparar monocapas de MGDG, DGDG y MGDG:DGDG 2:1 (p/p) que semejan la pared celular de las microalgas y evaluar la capacidad del péptido lítico melitina de insertarse y perturbarlas, con la finalidad de proponer a este péptido como un pretratamiento biológico alternativo a los actualmente reportados, para la extracción eficiente de aceites.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los lípidos monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) y digalactosil-diacilglicerol (DGDG) se adquirieron de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). La melitina se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los disolventes orgánicos de calidad analítica que se emplearon, cloroformo y metanol se obtuvieron de Merck.

Adsorción interfacial

La capacidad del péptido melitina para alcanzar la interfase aire-líquido y formar una monocapa, se analizó monitorizando los cambios en la presión superficial tras inyectar pequeños volúmenes de una solución metanólica de péptido a una concentración de 1mg/mL en la subfase acuosa. Para ello se utilizó una microcubeta de teflón de 1.5mL en la balanza de superficies de tipo Langmuir-Wilhelmy, rellena con buffer Tris 5mM pH 7.4 NaCl 100mM en agua bidestilada y con agitación continua para evitar que la difusión fuera la etapa limitante del proceso. La medida de la variación de la presión superficial se registró en función del tiempo. En los ensayos, se inyectaron entre 2 y 10 μ L de solución peptídica y la temperatura se mantuvo constante a 25°C.

Interacción de la melitina con monocapas lipídicas preformadas.

La tendencia de la melitina a interactuar con monocapas de MGDG o DGDG se analizó mediante el seguimiento de los cambios en la presión superficial ($\Delta\pi$) de monocapas lipídicas preformadas tras la inyección de soluciones peptídicas en la subfase acuosa sobre la que se formó una capa monomolecular de los galactolípidos a diferentes presiones iniciales (π_i). El incremento observado en la presión superficial tras la inyección del péptido se interpreta como una consecuencia de cambios en el empaquetamiento lateral debido a la interacción y posible posterior inserción de éste en la monocapa. La presión crítica de inserción (π_c) corresponde a la máxima presión inicial (π_i) de la monocapa que permite la interacción y eventual inserción del péptido. Los experimentos de inserción se realizaron en la misma microcubeta de teflón utilizada para los experimentos de adsorción. La monocapa se formó depositando pequeños volúmenes de soluciones concentradas de MGDG, DGDG o MGDG/DGDG 2:1 (p/p) en cloroformo/metanol 3:1 (v/v) sobre 1.5mL

de hipofase acuosa. Después de la formación de la monocapa a la presión inicial deseada y una vez permitida la evaporación del disolvente, se inyectaron 10 μ L de una solución metanólica de melitina a una concentración de 1mg/mL, registrándose los cambios en la presión superficial en función del tiempo. La inyección de cantidades equivalentes de metanol en ausencia de péptido permitió comprobar que el volumen utilizado de metanol no tenía efecto alguno en la presión lateral de las monocapas.

RESULTADOS

Las cinéticas de adsorción interfacial de los péptidos inyectados desde una solución metanólica en una subfase acuosa de buffer Tris 5mM pH 7.4 NaCl 100mM se muestran en la Figura 3. Como puede observarse, la melitina por sus características anfipáticas, es capaz de adsorberse rápida y espontáneamente a la interface aire-líquido, como puede deducirse del incremento casi instantáneo en la presión superficial, alcanzándose un valor de presión máximo en torno a 38mM/m, valor que ha permitido considerar a la melitina como una “proteína detergente” en la interface aire-líquido (Sessa et al. 1969). Esta sería la presión de equilibrio para películas interfaciales de melitina. Una vez alcanzada una determinada densidad de moléculas en la interface, la superficie acuosa se satura y no admite nuevas incorporaciones peptídicas, aunque se continúe añadiendo péptido en la subfase, lo que se refleja en una ausencia de cambios en la presión interfacial a partir de concentraciones de 1.6 μ M (Fig. 3 mismo número indicado anteriormente).

2.3. Interacción de la melitina con monocapas de galactolípidos preformadas

La capacidad de la interacción de la melitina con monocapas de lipídicas preformadas se analizó monitorizando los cambios en la presión superficial ($\Delta\pi$) de capas monomoleculares de los principales galactolípidos encontrados en las microalgas, a saber, monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) y digalactosil-diacilglicerol (DGDG) formadas a distintas presiones superficiales iniciales (π_i), para posteriormente inyectar 10 μ g de melitina en la subfase. Si como consecuencia de la interacción con la monocapa de galactolípido, el péptido penetra en la interfase aire-líquido o perturba el empaquetamiento lipídico, se produce un incremento en la presión superficial y puede detectarse y cuantificarse. La figura 4A ilustra los efectos en la presión superficial tras la inyección de la melitina bajo una monocapa de MGDG preformada a diferentes presiones.

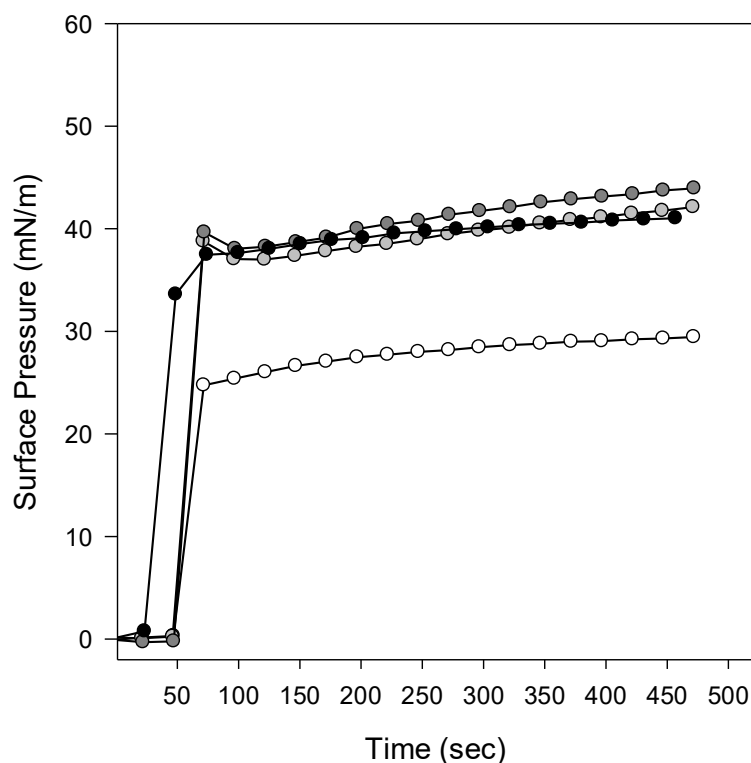


Figura 3. Cinética de adsorción interfacial de melitina después de su inyección a diferentes concentraciones en una subfase de buffer Tris 5mM pH 7.4 NaCl 100mM. Una vez limpia y estabilizada la subfase se inyectaron 2 (○), 5 (◐), 10 (◑) ó 20 (●) mg de péptido en un mínimo volumen de metanol (1-10μL), manteniendo la agitación y la temperatura (25°C) constantes. La adición de cantidades equivalentes de metanol no produjo efecto apreciable en la presión superficial.

Cuando las presiones iniciales a las que se formó la monocapa eran menores de 40mN/m, la inyección del péptido provocó un incremento casi instantáneo de la presión, como consecuencia de su asociación con la interfase. Sin embargo, si la monocapa era preformada a más de 40mN/m, cantidades equivalentes de melitina producen muy poco efecto en la presión superficial. Si las monocapas son de DGDG (Figura 4B), la melitina produce un incremento en la presión superficial al ser inyectada en la subfase de manera similar, siempre y cuando las monocapas preformadas se encuentren a $\pi < 20\text{mN/m}$, por encima de este valor, el péptido no es capaz de insertarse y solo se observa un ligero incremento en la presión superficial.

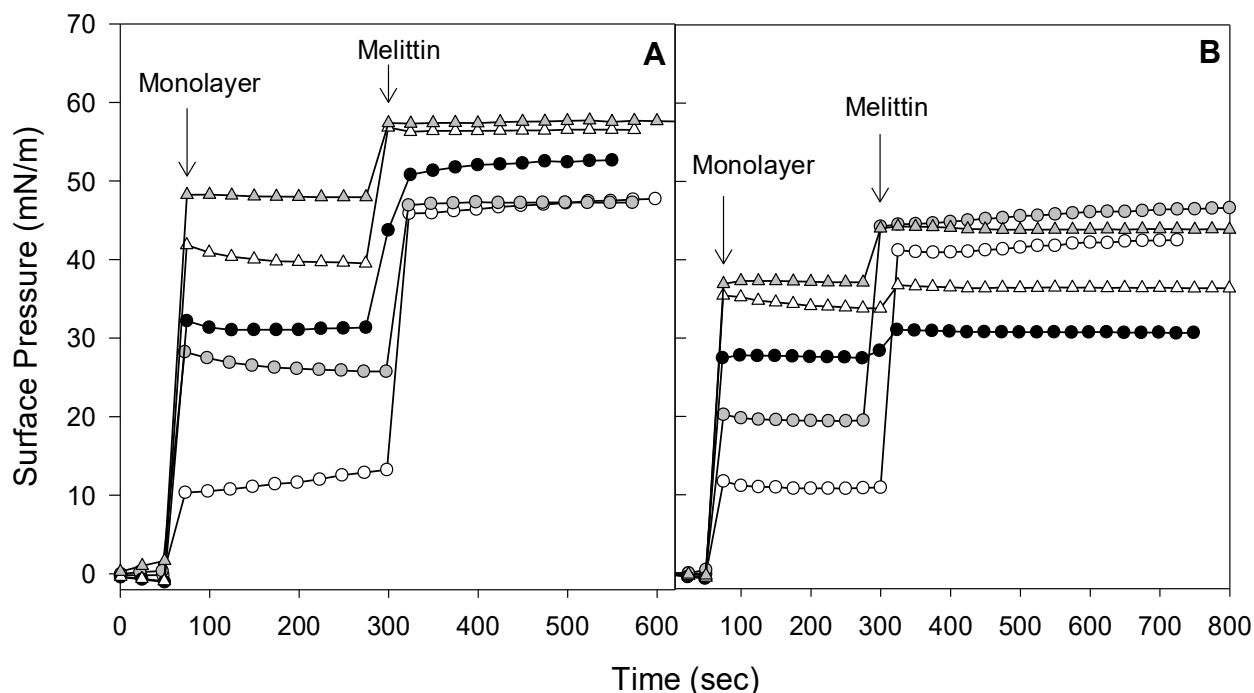


Figura 4. Cinéticas de inserción de la melitina en monocapas preformadas de MGDG (A) y DGDG (B) a 25°C. En el punto señalado con una flecha, diferentes cantidades de la mezcla lipídica se extendieron sobre la subfase acuosa desde una solución en cloroformo: metanol (2:1 v/v), para obtener monocapas a diferentes presiones iniciales (π_i). Después de un tiempo de estabilización de la monocapa, se inyectaron 10mg de melitina en la subfase en el momento indicado por la segunda flecha. El incremento de presión superficial debido a la interacción del péptido se monitorizó durante 10 minutos.

Estas diferencias sugieren que el comportamiento superficial de los galactolípidos contribuye significativamente en la asociación y estabilización de la melitina con la película interfacial. Finalmente, se evaluó la capacidad de inserción de la melitina en monocapas mixtas de MGDG/DGDG (2:1 p/p) que es la composición natural presente en la pared celular de las microalgas (Ye et al. 2013) y como puede observarse en la Figura 5, la inyección del péptido por debajo de una monocapa de MGDG/DGDG de 25mN/m de presión inicial, promueve un incremento instantáneo de 20mN/m en la presión superficial como consecuencia de la inserción de la melitina en los dominios lipídicos.

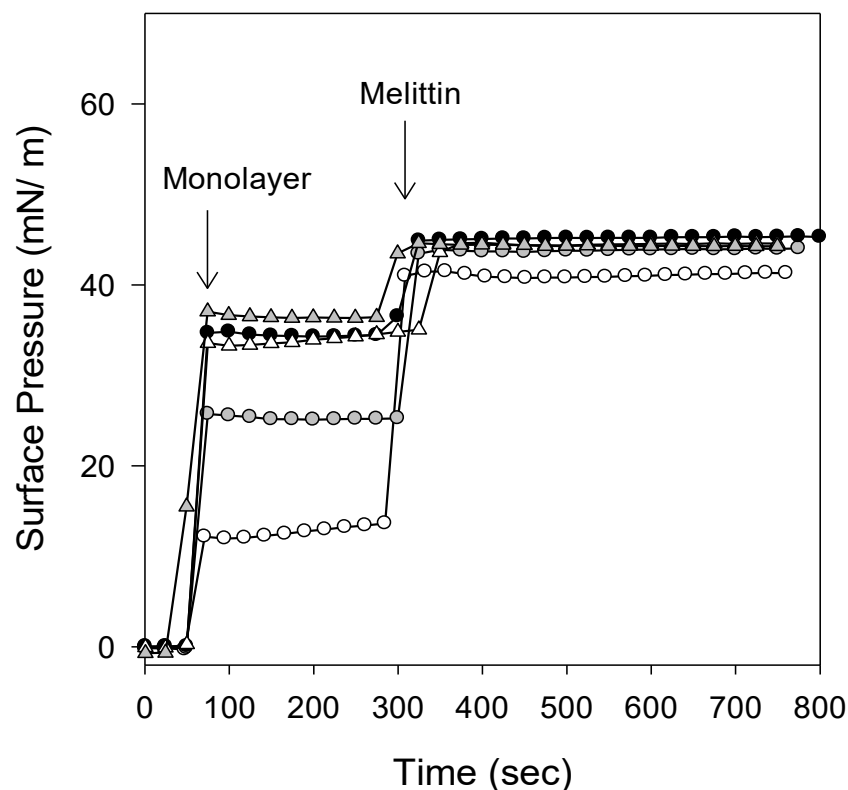


Figura 5. Cinéticas de inserción de la melitina en monocapas preformadas de MGDG/DGDG (2:1 p/p) preformadas a presiones iniciales (π_i) de 10 (○) 25 (●), 30, (●), 35 (△) y 40 (▲) mN/m a 25°C. La subfase estaba formada por buffer Tris 5mM pH 7.4 NaCl 100mM. El incremento de presión superficial debido a la interacción del péptido se monitorizó durante 10 minutos.

Al representar el incremento en la presión inducida por la melitina en función de la presión inicial (Figura 6), puede determinarse la presión crítica (π_c) que es el valor máximo de presión inicial (π_i) en el que todavía se detecta un incremento de presión debido a la asociación del péptido en la monocapa. La comparación de este valor para monocapas de distinta composición proporciona información sobre diferencias en la interacción péptido-lípido en la interfase.

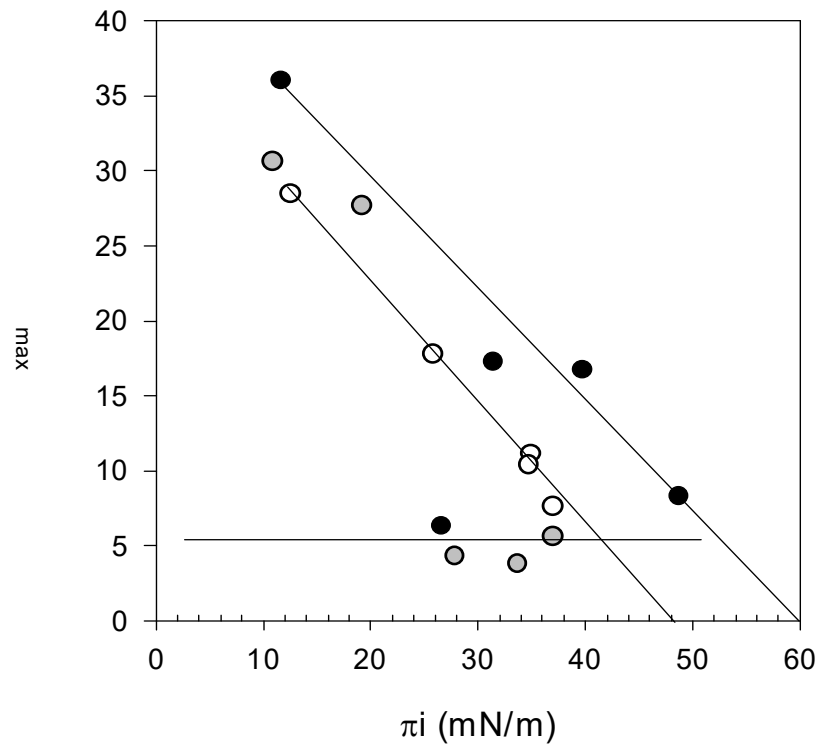


Figura 6. Incremento en la presión superficial (Δp) producido tras la inyección de 10 μg de melitina vs la presión inicial (π_i) de las monocapas de MGDG (●), DGDG (●) o MGDG: DGDG 2:1(○) preformadas sobre una subfase de buffer Tris 5mM pH 7.4 NaCl 100mM. La línea es el ajuste por regresión lineal de los datos experimentales. El punto de corte con el eje de las abscisas representa la presión crítica de inserción (π_c).

En la Tabla 2 se resumen los valores de π_c obtenidos para cada una de las monocapas evaluadas. Normalmente se considera que aquellas moléculas que son capaces de originar un incremento de presión en una monocapa formada a una presión inicial de 30mN/m o superior, son capaces de insertarse en bicapas lipídicas (Brockman 1999; Plasencia et al. 2005). Esta consideración parte de la base de que en una monocapa formada a 30mN/m, los lípidos soportan un empaquetamiento lateral similar al que tienen en una membrana. Así se determinó que la melitina es capaz de insertarse en monocapas preformadas de MGDG comprimidas hasta 60mN/m de presión superficial mientras que, en ausencia de este galactolípido, la melitina no es capaz de insertarse en la monocapa.

Tabla 2. Valores de presión crítica (π_c) para la interacción de la melitina con las monocapas preformadas de los galactolípidos MGDG y DGDG.

Composición de la monocapa	π_c (mN/m)
MGDG	60
DGDG	5
MGDG/DGDG 2:1	48

DISCUSIÓN

Los galactolípidos son el principal componente estructural de la pared celular de las algas verdes, siendo el monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) y el diagalactosil-diacilglicerol (DGDG) los galactolípidos predominantes (Ye et al. 2013). El MGDG es un galactolípido que tiene en su cabeza polar el grupo 1- β -galactosa unido al diacilglicerol, mientras que el DGDG presenta en la cabeza polar una α -galactosa unida mediante enlace (1,6) a la β -galactosa interna. Ambos galactolípidos están esterificados con grupos acilo en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol (Hoyo et al. 2016). La melitina es uno de los péptidos citolíticos más estudiados hasta la fecha. Es el principal componente del veneno de abeja y se le ha documentado como un péptido no selectivo, con alta actividad antimicrobiana y hemolítica (Hall et al. 2009) cuyas características anfipáticas permiten su asociación espontánea con membranas tanto artificiales como naturales (Gonzalez-Horta et al. 2017). En este capítulo se empleó la técnica de Langmuir para preparar monocapas de MGDG, DGDG y MGDG: DGDG 2:1 (p/p) que semejan la pared celular de las microalgas y evaluar la capacidad del péptido lítico melitina de insertarse y perturbarlas, con la finalidad de proponer a este péptido como un pretratamiento biológico alternativo a los actualmente reportados, para la extracción eficiente de aceites. Los resultados demuestran que la melitina es capaz de insertarse en monocapas de MGDG comprimidas hasta 60mN/m generando un incremento en la presión superficial mientras que, en monocapas preformadas por arriba de 20mN/m de DGDG, el péptido no es capaz de insertarse. En la mayoría de las algas verdes, el MGDG es un ácido graso poliinsaturado de 18 y 16 carbonos (18:3 *sn*-1 y 16:4 *sn*-2) y en menor proporción 18:3/16:3-MGDG, mientras que el DGDG es un galactolípido más saturado compuesto principalmente por los ácidos grasos 18:1, 18:2 o 18:3 en la posición *sn*-1 y 16:0 en la posición *sn*-2 (Kalisch et al. 2016). Se ha reportado que el galactolípido insaturado MGDG se encuentra en un estado líquido-expandido (LE) en todas las condiciones estudiadas hasta el momento, mientras que el galactolípido saturado DGDG se encuentra en fase LE a presiones superficiales menores a 10mN/m y presenta un cambio de fase al estado líquido-condensado (LC) alrededor de 20mN/m. La compresión en una monocapa saturada de DGDG obliga a la reorientación de las cabezas polares, favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno

entre las moléculas de DGDG, lo cual se refleja como un incremento en la compresibilidad de la monocapa (Gzyl-Malcher et al. 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la capacidad de la melitina para interactuar e insertarse en monocapas en estado LE, pero cuando el lípido pasa a un estado LC donde se encuentra densamente empaquetado, el péptido no tiene la suficiente afinidad por los lípidos para sustituir las interacciones lípido-lípido por interacciones péptido-lípido. El hecho de que los valores de presión crítica para la inserción de la melitina en monocapas que contienen MGDG ($\pi_c=60\text{mN/m}$ para MGDG pura y $\pi_c=48\text{mN/m}$ para la mezcla lipídica) resultara mucho mayor que la presión crítica obtenida para monocapas de DGDG pura ($\pi_c=5\text{mN/m}$) puede explicarse debido a que en la mezcla de lípidos insaturados MGDG/DGDG, la cabeza polar del MGDG obliga que la cabeza polar de DGDG presente una orientación diferente, induciendo una mayor hidratación que en los componentes puros. Esto concuerda con las observaciones hechas por otros autores que reportan que monocapas de MGDG/DGDG se encuentran en fase LE y que pueden formar sistemas miscibles dentro de la monocapa en la interface aire-líquido (Bottier et al. 2007; Gzyl-Malcher et al. 2008), por lo que la melitina puede insertarse y perturbar este tipo de monocapas. En un estudio más reciente en el que se emplea microscopía de fuerza atómica (AFM), se revela que la melitina es capaz de eliminar la formación de fase LC, induciendo defectos lipídicos localizados exclusivamente en la fase LE, siendo el tamaño de estos defectos o dominios de 3.8nm a una concentración de 1% molar de péptido después de 34min de incubación (Pan y Khadka 2016). Así pues, los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la melitina tienen propiedades intrínsecas para interactuar y perturbar monocapas interfaciales que simulan la pared celular de las microalgas. Por lo que puede concluirse que la melitina accede a regiones profundas de las monocapas en estado LE compuestas por los principales galactolípidos presentes en la pared celular de las microalgas. Esta observación nos permite proponerla como un pretratamiento para hacer la pared celular de las microalgas lo suficientemente permeable para incrementar la extracción de lípidos neutros, lo cual se abordará en el siguiente capítulo de este trabajo.

CAPÍTULO 2.

RESUMEN

Una de las principales limitantes para la competitividad económica de los biocombustibles de tercera generación es la incapacidad de sus células para excretar los lípidos que típicamente se encuentran encapsulados dentro de gránulos intracelulares, motivo por el cual la tecnología utilizada deberá implicar el rompimiento de las estructuras de membrana y pared celular para la liberación del producto de interés, dicha etapa reviste uno de los eventos más críticos y costosos del proceso, lo cual le impide competir exitosamente en el mercado con los demás tipos de combustibles.

Actualmente se utiliza una amplia gama de métodos para la recuperación de lípidos, sin embargo, la selección del método adecuado dependerá de su eficiencia, costo, exactitud, aplicabilidad y lo más importante, la precisión y repetibilidad. hasta el momento no se ha desarrollado un método con dichas características. Como un método alternativo se propone la melitina, un péptido lítico ampliamente estudiado para el seguimiento de los mecanismos de formación de poros e interacciones lípido-proteína en las membranas, posee una alta actividad antiviral y antimicrobiana, además de propiedades citotóxicas sobre células de mamíferos. A pesar de esto, aún no se tienen reportes del efecto de este péptido en las microalgas. En esta investigación al realizar la evaluación del efecto del péptido melitina sobre la microalga *N. oleoabundans*, se observó que si causa una disrupción celular y con esto se obtuvo un incremento del doble en la cantidad de lípidos recuperados.

INTRODUCCIÓN

El consumo acelerado de los combustibles fósiles en las últimas décadas, junto a la actual incertidumbre sobre el cambio climático en el plantea, han dado lugar a un creciente interés comercial por los combustibles renovables. A este respecto, una de las alternativas más viables para disminuir nuestra inmensa dependencia por los combustibles a base de petróleo, la constituye el biodiesel, cuya producción involucra la trans esterificación de los lípidos extraídos regularmente a partir de plantas, aunque recientemente las microalgas se han convertido en una de las alternativas más prometedoras, esto es debido a que acumulan en sus células, grandes proporciones de lípidos (hasta el 50% de su peso seco en algunas especies) y generan altos rendimientos de biomasa. A diferencia de los cultivos vegetales productores de aceites biocombustibles, estos microorganismos se pueden cultivar en pequeños espacios de tierras no-agrícolas, ya sea en agua dulce o salada y con mínimos requerimientos nutricionales para crecer (Nigam y Shing 2011).

Una las principales limitantes para la competitividad económica de los biocombustibles de tercera generación es la incapacidad de sus células para excretar los lípidos que típicamente se encuentran encapsulados dentro de gránulos intracelulares, motivo por el cual la tecnología utilizada deberá implicar el rompimiento de las estructuras de membrana y pared celular para la liberación del producto de interés, dicha etapa reviste uno de los eventos más críticos y costosos del proceso, lo cual le impide competir exitosamente en el mercado con los demás tipos de combustibles.

Neochloris oleoabundans es una especie de microalga de agua dulce que puede acumular hasta el 50% de lípidos en biomasa seca bajo condiciones fotoautotróficas (Li et al. 2008) y el 80% de sus lípidos son triacilglicéridos y la mayoría de sus ácidos grasos saturados están en el rango de 16-20 carbonos (Tornabene et al. 1983.) lo cual hace que esta cepa sea ideal para la producción de biodiesel. Las microalgas almacenan sus compuestos valiosos dentro de la célula que regularmente está protegida por una pared celular gruesa, la cual en la mayoría de las microalgas consiste en polisacáridos (celulosa, pectina y/o algenano) y proteínas (Johansen 2012), además su respuesta a los cambios en el medio de crecimiento es una consideración importante (Yap et al. 2014).

Se ha reportado una amplia gama de métodos para la extracción de lípidos, la selección del método adecuado dependerá de su eficiencia, costo, exactitud, aplicabilidad y lo más importante, la precisión y repetibilidad. (Rawat et al. 2013) hasta el momento no se ha desarrollado un método con dichas características. En general, dichos métodos se basan en métodos físicos (microondas, sonicación) y métodos químicos (solventes y mezclas de solventes, fluidos supercríticos) (Zhu et al. 2017). Entonces es necesario un método de disrupción celular es necesario para potenciar los rendimientos de las extracciones que solvente esta problemática. (Baudalet et al. 2017). Como un método alternativo se propone la melitina, la cual es el principal componente activo del veneno de la abeja, un péptido lítico ampliamente estudiado para el seguimiento de los mecanismos de formación de poros e interacciones lípido-proteína en las membranas, posee una alta actividad antiviral y antimicrobiana, además de propiedades citotóxicas sobre células de mamíferos. (Asthana et al. 2004; Hyun-Ji et al. 2013; Khatun y Mukhopadhyay 2013). Puede dirigirse a células vivas como los glóbulos rojos y unirse a las membranas lipídicas de forma espontánea conduciendo al rompimiento de la bicapa lipídica y hemólisis. (Hall et al. 2011). A pesar de que se ha reportado la actividad del péptido contra diversos tipos de células, aún no se tienen reportes del efecto de este en las microalgas, por lo tanto, con esta investigación se pretendía evaluar el efecto lítico del péptido melitina sobre la cantidad de lípidos neutros recuperados de la microalga *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185 bajo diferentes condiciones de cultivo que fueron concentración de nutrientes y temperatura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de la cepa *Neochloris oleoabundans* bajo diferentes condiciones

En el presente trabajo se utilizó la cepa *Neochloris oleoabundans* UTEX1185, que fue obtenida de la colección de cultivos de algas UTEX de la Universidad de Texas en Austin (Austin, TX, USA). La microalga fue mantenida y propagada en matraces Erlenmeyer de 250mL manteniendo en agitación en un agitador Lab line 3527 a 25°C con 150rpm, los matraces contenían medio Bristol esterilizado en autoclave a 121°C durante 30 minutos. El cultivo se llevó a cabo en medio Bristol y medio Bristol modificado con diferentes concentraciones de nitratos y fosfatos (Tabla 1,2 y 3) contenido en fotobiorreactores tipo air-lift con un volumen de cultivo de 1 litro (Figura 1.) acoplados con bombas de aire para acuario con un flujo constante; dichos fotobiorreactores se encontraban adecuados para proporcionar una intensidad lumínica de $490 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad mediante lámparas fluorescentes de 20 Watts y un temporizador, así como también se manejaron temperaturas de 25°C y 32°C, que fueron ajustadas automáticamente mediante un termostato sumergible por cada fotobiorreactor. Todos los cultivos se manipularon en esterilidad, realizando las medidas comunes de asepsia.

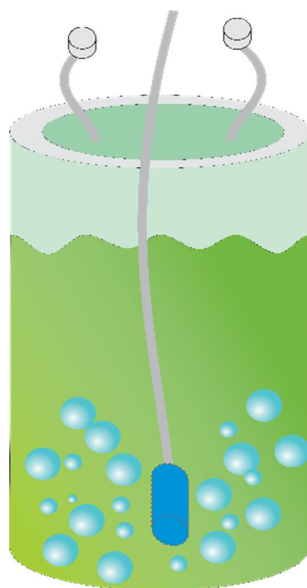


Figura 7. Representación del fotobiorreactor tipo "air-lift" empleado en esta investigación.

Tabla 3.Composición del medio de cultivo Bristol.

COMPUESTO	CANTIDAD (mL/L)	CONCENTRACIÓN DE STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
NaNO ₃	10	10g en 400 ml de H ₂ O	2.94 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	10	1g en 400 ml de H ₂ O	0.17 mM
NaCl	10	3g en 400 ml de H ₂ O	0.3 mM
KH ₂ PO ₄	10	3g en 400 ml de H ₂ O	0.43 mM
CaCl ₂	10	7g en 400 ml de H ₂ O	1.29 mM
K ₂ HPO ₄	10	1g en 400 ml de H ₂ O	0.43 mM

Tabla 4.Composición del medio Bristol modificado deficiente de nitratos y fosfatos.

COMPUESTO	CANTIDAD (mL/L)	CONCENTRACIÓN DE STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
NaNO ₃	5	10g en 400 ml de H ₂ O	1.47 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	10	1g en 400 ml de H ₂ O	0.17 mM
NaCl	10	3g en 400 ml de H ₂ O	0.3 mM
KH ₂ PO ₄	5	3g en 400 ml de H ₂ O	0.215 mM
CaCl ₂	10	7g en 400 ml de H ₂ O	1.29 mM
K ₂ HPO ₄	10	1g en 400 ml de H ₂ O	0.43 mM

Tabla 5.Composición del medio Bristol modificado exceso de nitratos y fosfatos.

COMPUESTO	CANTIDAD (mL/L)	CONCENTRACIÓN DE STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
NaNO ₃	50	10g en 400 ml de H ₂ O	14.7 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	10	1g en 400 ml de H ₂ O	0.17 mM
NaCl	10	3g en 400 ml de H ₂ O	0.3 mM
KH ₂ PO ₄	50	3g en 400 ml de H ₂ O	2.15 mM
CaCl ₂	10	7g en 400 ml de H ₂ O	1.29 mM
K ₂ HPO ₄	10	1g en 400 ml de H ₂ O	0.43 mM

Efecto del pretratamiento sobre la microalga *Neochloris oleoabundans* aplicando la concentración máxima de melitina obtenida de las cinéticas de liberación de las vesículas modelo.

-Preparación de células para experimentación.

Antes de realizar las evaluaciones correspondientes, las células se encontraban suspendidas en los diferentes medios de cultivo por lo cual fue necesario eliminar cualquier remanente de dichos medios mediante lavados celulares, los cuales consistieron en obtener 40 mL de los fotobiorreactores en tubos Corning® y se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua desionizada. Los lavados se repitieron tres veces para cada condición. Una vez que se contó con las células lavadas, se procedió a ajustar los cultivos a la misma densidad óptica que fue de 0.35 en un espectrofotómetro UV-VIS (BIO-RAD Smast Spec 3000) a una longitud de onda de 750 nm.

-Condiciones de reacción para la aplicación del pretratamiento con el péptido melitina.

Se analizó el efecto del péptido melitina sobre la microalga cultivada bajo las siguientes condiciones:

Tabla 6. Condiciones de cultivo a las que se aplicó el pretratamiento del péptido melitina.

Temperatura	Concentraciones de nutrientes		Nomenclatura
	Nitratos	Fosfatos	
25°C	14.71	6.42	25°SA
	2.94	1.29	25°SN
	0.642	1.47	25°SB
32°C	14.71	6.42	32°SA
	2.94	1.29	32°SN
	0.642	1.47	32°SB

Para evaluar el efecto del péptido melitina sobre las células de *N. oleoabundans* bajo diferentes condiciones de cultivo se tomaron alícuotas de 1 mL y se depositaron en tubos Eppendorf®, los cuales depositaron en un Thermomixer y se les aplicó el péptido melitina a una concentración de 10µg/ml a partir de un stock de 1mg/mL disuelto en metanol. El péptido melitina fue obtenido de Sigma®. El tiempo de incubación fue de 0.5 horas y los experimentos se llevaron a cabo bajo las condiciones de agitación constante a 1400 rpm con una temperatura de 37°C siendo esta la temperatura ideal para la acción de la melitina.

-Medición de Intensidad de fluorescencia

Una manera para realizar mediciones de lípidos que es sencilla y requiere de poca cantidad de muestra, es la medición de intensidad de fluorescencia mediante la sonda fluorescente Rojo Nilo (9-diethyl- amino-5H-benzo[a] phenoxazine-5-one), la cual se obtuvo de Sigma® y se preparó una solución stock a una concentración de [0.25mg/ml], en dicha técnica se depositaron 5 µL de la sonda fluorescente en 1 mL de muestra obtenida de los ensayos anteriores, la reacción se depositó en una cubeta de 0.2cm de paso óptico, manteniendo la anchura de las rendijas fijas a 10 nm para los haces de excitación y emisión. Se realizaron las lecturas en el espectrofluorímetro LS-45 Perkin Elmer y los espectros fueron registrados desde 500nm hasta 750nm con una velocidad de barrido de 1nm/seg empleando una longitud de onda de excitación de 490 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

Para la evaluación de la liberación de lípidos, se centrifugó a 16,000 g durante 10 min las muestras después de la evaluación de las células en suspensión y se obtuvo pellet y sobrenadante, los cuales se analizaron por separado bajo el método de medición de intensidad de fluorescencia mencionado anteriormente.

-Análisis cuantitativo del contenido lipídico mediante intensidad de fluorescencia.

Se empleó una curva estándar a partir de la trioleína (estándar de ácidos grasos) obtenida de Wako chemicals para determinar cuantitativamente el contenido lipídico. Para esto, se preparó una solución stock del estándar a una concentración de 10 mg/mL en alcohol isopropílico, a partir de dicha solución se prepararon diferentes concentraciones que fueron 0,2.5, 5, 10, y 20 mg/L. Posteriormente se añadieron 8 µl de la sonda fluorescente

a cada concentración y se procedió a realizar las lecturas bajo la técnica de la medición de intensidad de fluorescencia bajo los parámetros previamente utilizados. Para la construcción de la curva estándar de trioleína, se consideró la intensidad de fluorescencia máxima en torno a 580 nm.

Efecto a nivel celular de la melitina como método de disrupción sobre la microalga *Neochloris oleoabundans*.

-Determinación del porcentaje de disrupción celular.

De las muestras tratadas con el péptido, se tomaron alícuotas de 30 µL para realizar conteos celulares en una cámara de Neubauer, los cuales se realizaron por triplicado. Posteriormente a partir de los conteos obtenidos, se calculó el porcentaje de disrupción celular mediante la siguiente fórmula:

(Halim et al. 2012)

$$D = \frac{Cb - Ca}{Cb} \times 100$$

Donde:

Cb: promedio del conteo de células intactas antes del tratamiento con el péptido.

Ca: promedio del conteo de células intactas después del tratamiento con el péptido.

Comparación del incremento lipídico en la extracción por solventes en ausencia y presencia del pretratamiento.

Otra manera de evaluar el contenido lipídico cuantitativamente es mediante la extracción de lípidos mediante solventes. En particular, se empleó la técnica de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1959). Se secó la biomasa obtenida del tratamiento con el péptido melitina a una concentración de 10 µg/ml y evaluó también un control negativo. Se obtuvieron 180 mg a los cuales se ajustaron las cantidades proporcionales de cloroformo:metanol y agua. Al tubo que contenía la suma de las dos fases clorofórmicas se evaporó el cloroformo y se mantuvo a peso constante, el contenido de lípidos se obtuvo mediante la diferencia de pesos.

Preparación de células para microscopia de fluorescencia, microscopia confocal y microscopia electrónica de barrido.

A partir de las células bajo la condición que presentaron un mayor grado de disrupción y mayor contenido lipídico recuperado, se realizaron tres diferentes técnicas microscópicas para comprobar y observar el efecto del péptido melitina sobre las células de la microalga *Neochloris oleoabundans*. En el caso de la microscopia de fluorescencia y confocal fue necesario realizar una tinción con la sonda fluorescente Rojo Nilo que fue empleada en previos experimentos, para la cual, por cada mL de muestra de células en suspensión tratadas con el péptido, se añadieron 8 μ L a partir de la solución stock que se encontraba a una concentración de 0.25 mg/mL. Para realizar las observaciones microscópicas, se empleó un microscopio Leica DM 750 adaptado para láser de fluorescencia, mediante el filtro amarillo se realizaron las observaciones de las células bajo la condición de cultivo 32°SA en campo claro y fluorescencia con los objetivos 40x y 100x.

Microscopia confocal

Para teñir los cuerpos lipídicos de las células mediante microscopia confocal, se empleó un microscopio confocal Olympus BX61WI con una excitación de banda del filtro a 595nm y una emisión de banda del filtro de 615nm a un aumento de 60X y con un zoom digital Z.

Microscopia electrónica de barrido

Para esta técnica se requirió un procedimiento de preparación de muestra previo a la observación, el cual consistió en realizar un lavado celular en repetidas ocasiones con buffer de fosfatos. Posteriormente, se realizó una fijación de las células con glutaraldehído al 2% el cuál se preparó disolviendo 250 μ l al 10% en 750 μ l buffer de fosfatos. Se dejaron incubar las células fijadas a 4°C durante 7 horas en un desecador. El siguiente paso que se realizó fue la deshidratación, en la cual las células se pasaron en series de alcohol al 30%, 50%, 75%, 95%, y 100% v/v, y se dejó la muestra 5 minutos entre cada concentración. Entre cada concentración se realizó una centrifugación a 5,000 rpm durante 5 minutos para eliminar residuos. Finalmente se puso una gota de muestra en cada portamuestras y se dejó evaporar, se almacenaron los portamuestras en un desecador hasta

el análisis en el microscopio Jeo I JSM-6510LV con 15kv de corriente, WD de 12mm y spot de 5550.

Análisis estadísticos

Todos los análisis se realizaron por triplicado en experimentos independientes. Para analizar los datos, se debieron cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, para lo cual se utilizó la prueba de contraste de Levene en la que se contrasta la hipótesis nula de la varianza del error de la variable dependiente (IF, equivalentes de trioleína, % de disrupción celular y % w/w de lípidos extraídos) es igual a lo largo de todos los grupos. Posteriormente se analizaron los datos mediante un análisis de comparación de medias con la prueba T-student para muestras independientes y análisis de varianza (ANOVA), en donde se contrastaron las hipótesis correspondientes de la variable dependiente sometida a los tratamientos, utilizando para ello el paquete informático IBM SPSS Statistics versión 20 ®. En todos los casos del análisis estadístico, se aplicó un nivel de significación $P=0.05$.

RESULTADOS

Se logró el acondicionamiento de la microalga *N. oleoabundans* en el medio de cultivo Bristol donde posteriormente se inoculó en los fotobiorreactores bajo las diferentes condiciones de cultivo (Figura 8) donde A. fue el día inicial y B. cuando las microalgas alcanzaron su fase estacionaria y se encontraban listas para su posterior experimentación. Las cinéticas de crecimiento se encuentran en el anexo de este documento, ya que no representan relevancia para la investigación presente, aun así, se realizó el monitoreo correspondiente de la estimación del número de células cada 48 horas.

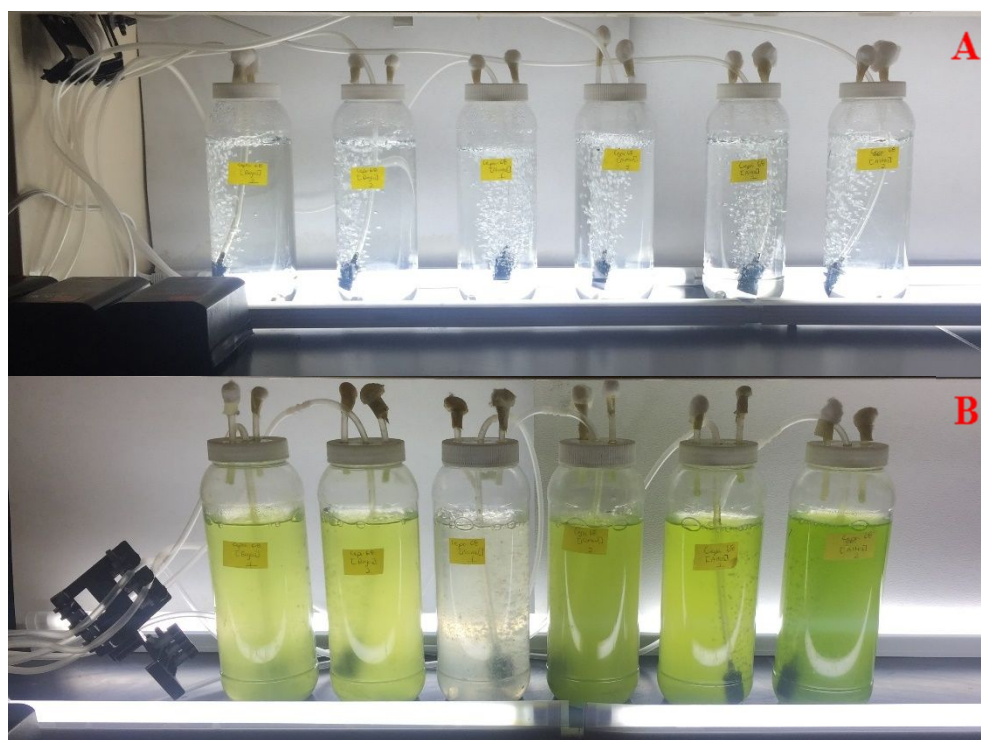


Figura 8. Crecimiento de la microalga *Neochloris oleoabundans* en fotobiorreactores tipo air-lift. El cultivo se realizó con diferentes concentraciones de nutrientes y a 25° C y 32° C; con una intensidad de luz de 490 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 12:12. **A.** Primer día de crecimiento. **B.** Último día de crecimiento cuando el cultivo se encontraba en fase estacionaria.

Análisis cualitativo de la obtención de lípidos neutros por *N. oleoabundans*.

Como se mencionó anteriormente en los antecedentes, la pared celular de las microalgas no es igual entre las diferentes especies, incluso las condiciones de cultivo pueden afectar en la composición de dicha pared, debido a esto, se aplicó el método de la medición de la intensidad de fluorescencia de la sonda Rojo Nilo para la rápida y sencilla evaluación del efecto del péptido melitina sobre las microalgas cultivadas bajo todas las condiciones. Dicho método arrojó valores en unidades arbitrarias (u.a.) en donde se esperó observar un incremento en la intensidad de fluorescencia en torno a 580 nm, lo que indicaba de manera cualitativa la presencia de lípidos. A condiciones de cultivo de 25° y las tres diferentes concentraciones de nutrientes, no se observó diferencia del tratamiento respecto al control, presentándose un nulo incremento en la intensidad de fluorescencia (Figura 9).

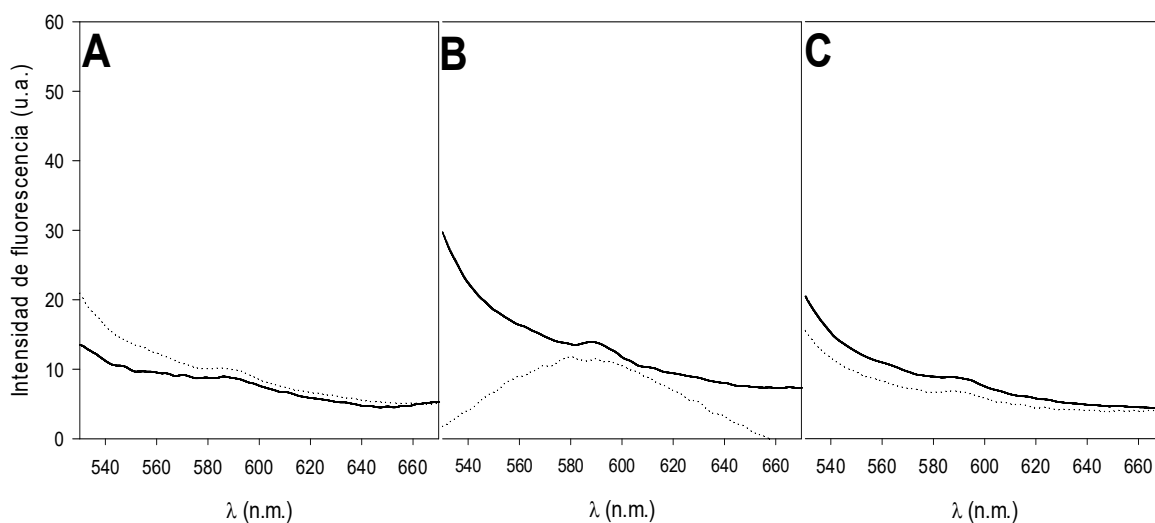


Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia del tratamiento con melitina 10µg/ml sobre la microalga *N. oleoabundans* cultivada a 25°C y diferentes concentraciones de nutrientes A: SB-N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: SN- N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: SA-N 14.71mM, P 6.42mM. La línea punteada representa el tratamiento y la línea continua representa el control negativo. La intensidad de fluorescencia se presenta en unidades arbitrarias.

En lo que respecta a las condiciones de cultivo de 32° y la concentración de nutrientes SB y SN, también se observó un incremento nulo en la intensidad de fluorescencia del tratamiento con respecto al control. Lo contrario ocurrió únicamente con la concentración

de nutrientes SA, en donde se logró observar un incremento de aproximadamente 20 u. a. en la intensidad de fluorescencia en torno a 580nm de la sonda Rojo Nilo unida a las microalgas bajo tratamiento con respecto al control (Figura 10).

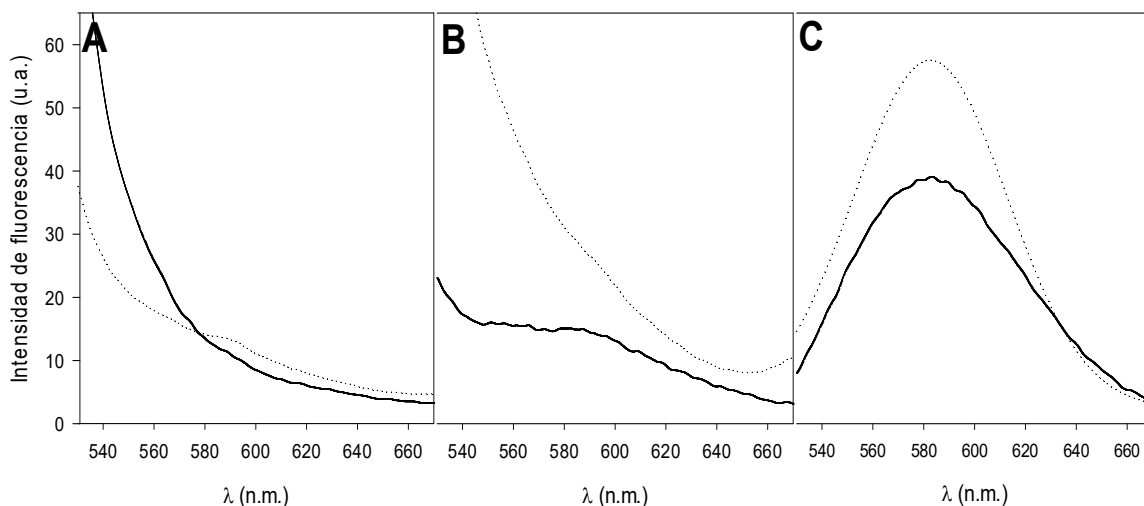


Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia del tratamiento con melitina 10ug/ml sobre la microalga *N. oleoabundans* cultivada a 32°C y diferentes concentraciones de nutrientes A: SB-N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: SN- N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: SA-N 14.71mM, P 6.42mM. La línea punteada representa el tratamiento mientras que la línea continua al control negativo. La intensidad de fluorescencia se presenta en unidades arbitrarias.

Para observar una posible liberación de lípidos en el medio, se evaluó el pellet y sobrenadante de la suspensión de la microalga después de la incubación con el péptido melitina; se obtuvieron los espectros de fluorescencia de todas las condiciones de cultivo, presentándose un aparente efecto nulo del tratamiento en el caso de la condición de cultivo a 25° y bajo todas las concentraciones de nutrientes, lo mismo ocurrió para la condición de cultivo a 32°C y bajo la concentración de nutrientes SB (Figura 11). Sin embargo, bajo 32° y la concentración de nutrientes SN y SA, se presentó un incremento en suspensión, pellet y sobrenadante bajo el tratamiento con melitina con respecto al control (Figura 12). En la Figura 13 se muestran los datos en forma de histograma de la intensidad de fluorescencia de la sonda unida a la suspensión, pellet y sobrenadante de cada muestra, en donde el inciso 1 corresponde a la condición de cultivo a 25°C y el inciso 2 a 32°C. Al evaluarse la intensidad de fluorescencia en la suspensión, de acuerdo con el análisis estadístico realizado (Anexo) solo se presentaron diferencias significativas en el

incremento de la intensidad de fluorescencia entre el control y el tratamiento con el péptido melitina sobre las microalgas cultivadas a 32°C y la concentración de nutrientes SN y SA , mientras que bajo las demás condiciones de cultivo no se pudo observar la existencia de un efecto significativo del tratamiento sobre las células de las microalgas. En la evaluación de la intensidad de fluorescencia del pellet y el sobrenadante, ocurrió el mismo efecto mencionado anteriormente.

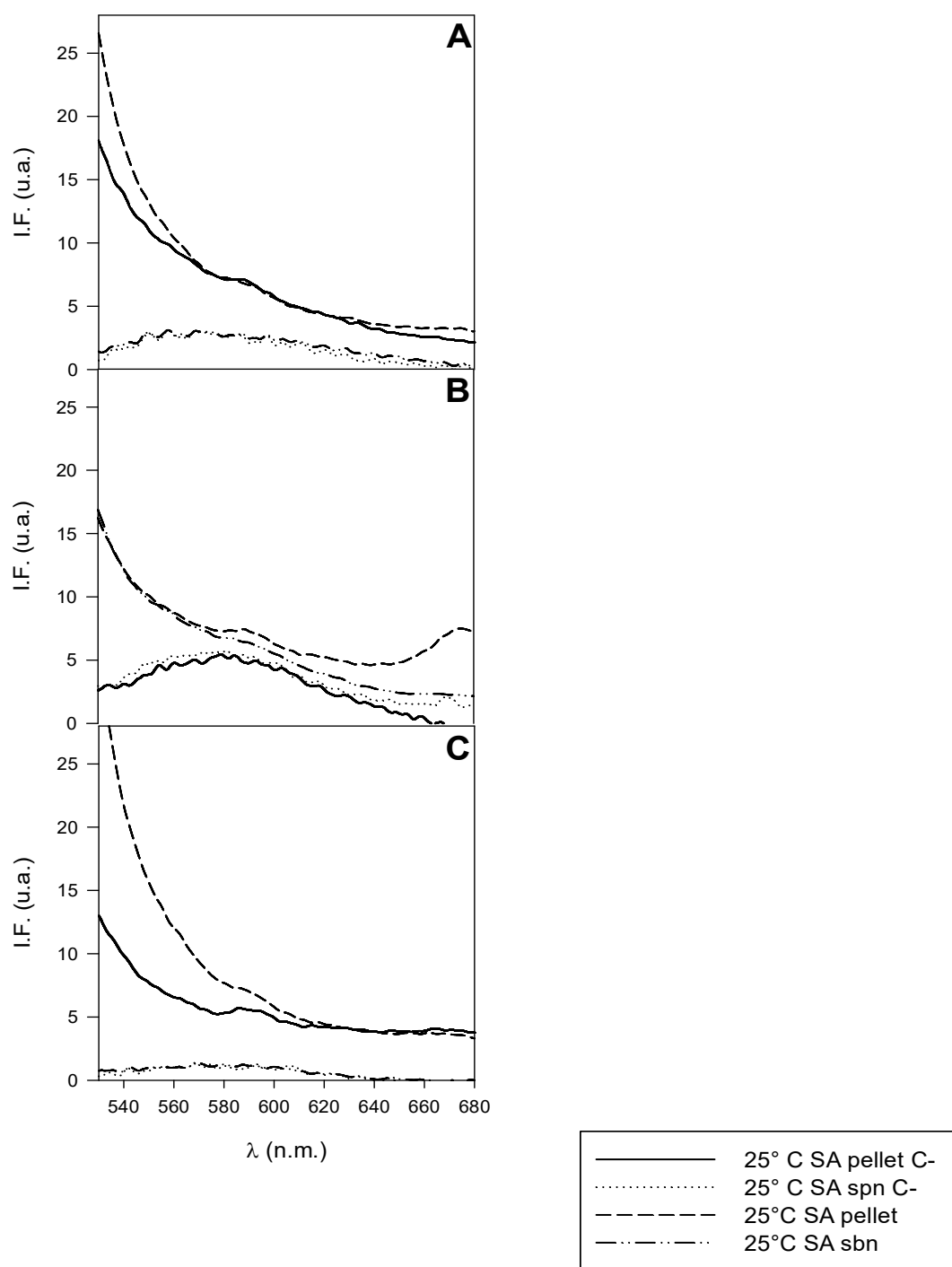


Figura 11. Espectros de emisión de fluorescencia del pellet y sobrenadante de la microalga *N. oleoabundans* cultivada a 25°C; bajo el tratamiento de melitina 10 µg/ml. A: SB-N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: SN- N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: SA-N 14.71mM, P 6.42mM. En cada gráfico se representa el control y el tratamiento. La intensidad de fluorescencia se presenta en unidades arbitrarias.

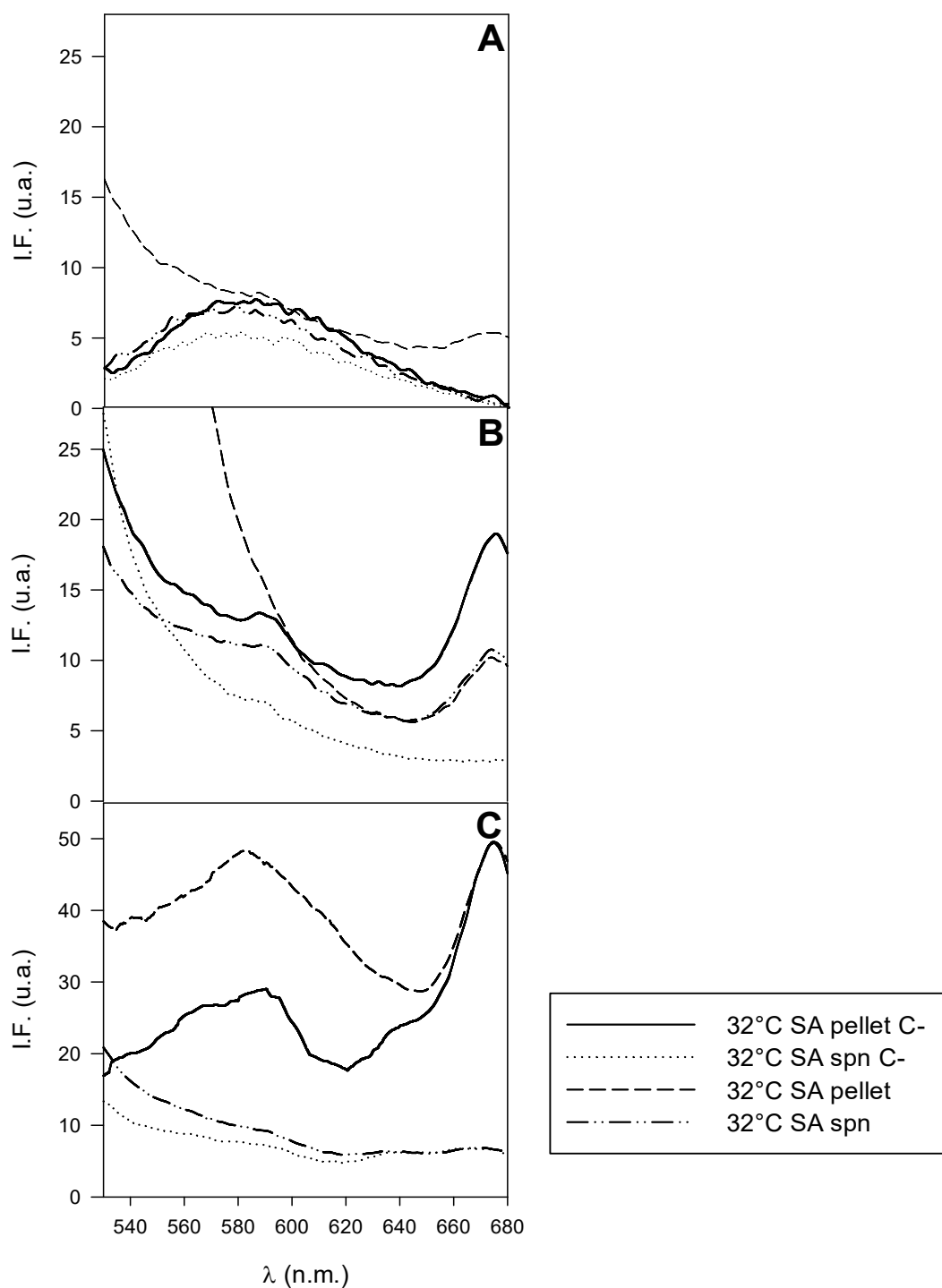


Figura 12. Espectros de emisión de fluorescencia del pellet y sobrenadante de la microalga *N. oleoabundans* cultivada a 32°C; bajo el tratamiento de melitina 10 $\mu\text{g/ml}$. A: SB-N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: SN- N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: SA-N 14.71mM, P 6.42mM. En cada gráfico se representa el control y el tratamiento. La intensidad de fluorescencia se presenta en unidades arbitrarias.

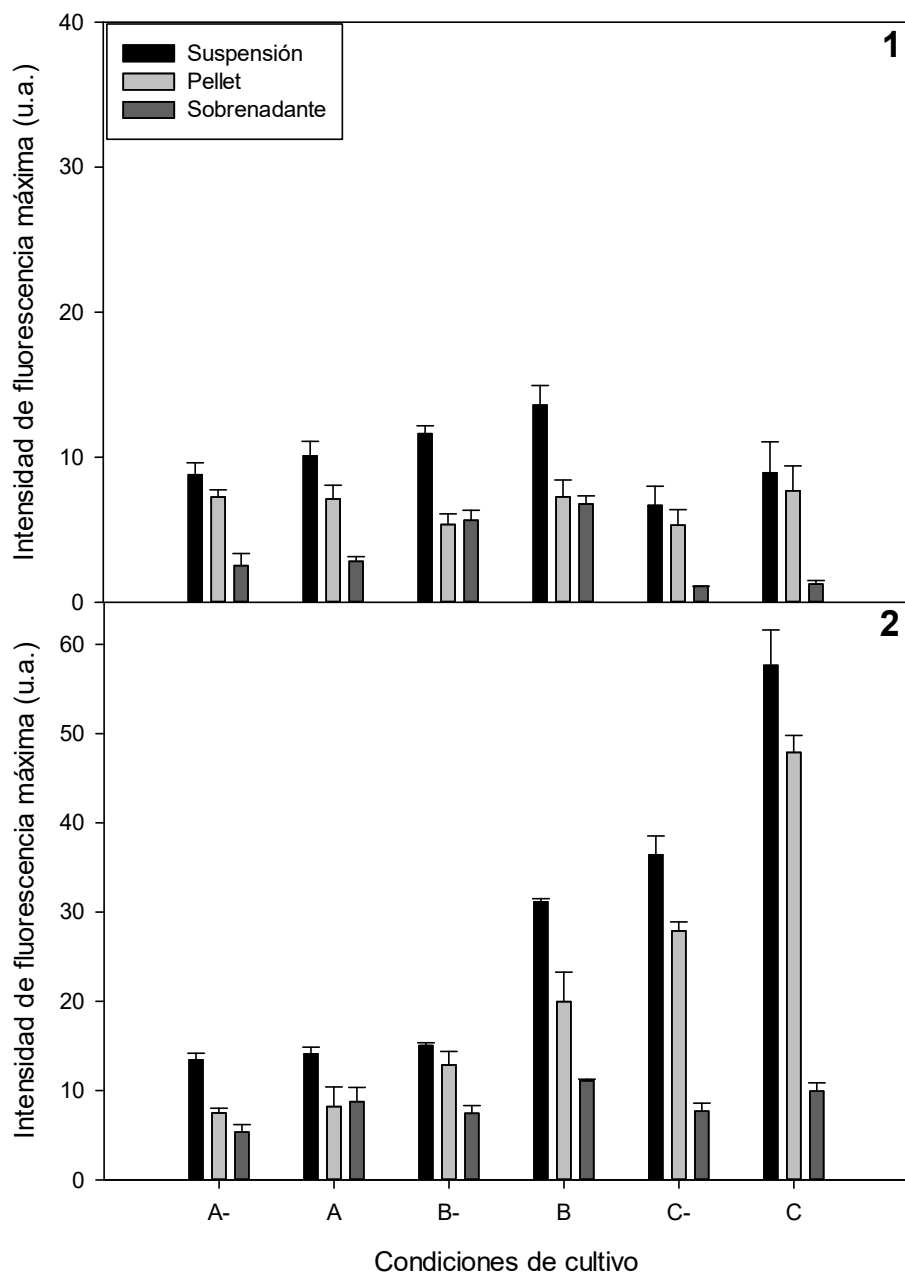


Figura 13. Representación del efecto de la melitina sobre la liberación de lípidos de la microalga *N. oleoabundans* cultivada a 1. 25°C y 2. 32°C. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: A: SB-N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: SN- N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: SA-N 1414.71mM, P 6.42mM. En donde (-) indica el control negativo. Los valores se presentan en intensidad de fluorescencia máxima (en torno a 580nm). Los datos presentados son las medias y las desviaciones estándar de las tres repeticiones. $P < 0.05$ (Prueba T-student).

Análisis cuantitativo de la obtención de lípidos neutros por *N. oleoabundans*.

Para el análisis cuantitativo, se empleó un estándar de trioleína y se realizó una curva de calibración de dicho estándar empleando diferentes concentraciones, por lo que se muestra en la Figura 14. la correlación linear entre las diferentes concentraciones de la trioleína y la intensidad de fluorescencia máxima en torno a 580 nm de la sonda unida al estándar; el valor de R resultó ser de 0.9887. Mediante dicha curva, se pudo realizar el análisis cuantitativo de los datos obtenidos anteriormente, los cuales se tenían en unidades arbitrarias para ser convertidos a unidades equivalentes de trioleína (mg/L), los cuales se muestran en la Figura 15.

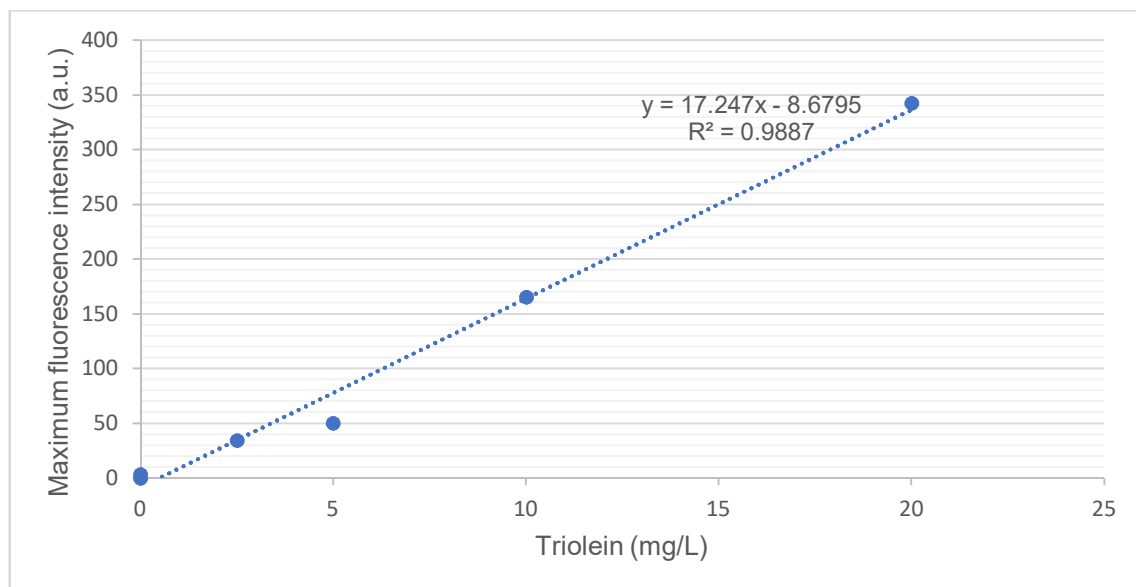


Figura 14. Correlación linear entre diferentes concentraciones del estándar de lípidos trioleína y la intensidad de fluorescencia máxima en torno a 580nm obtenida mediante la técnica del Rojo Nilo. Las lecturas se obtuvieron a una velocidad de barrido de 1nm/ sec. El valor de R es de 0.9887.

Mediante el análisis estadístico empleado, se comprobó que en la evaluación de la suspensión existe diferencia significativa en los mg/L de equivalentes de trioleína entre el control y el tratamiento con el péptido melitina aplicado a las células cultivadas bajo 32°C y concentraciones de nutrientes SN y SA. En lo que respecta a los resultados del pellet, se presentaron diferencias significativas en la cantidad de equivalentes de trioleína entre el control y el tratamiento con la melitina sobre las células cultivadas bajo las concentraciones de nutrientes 25°C y 32°C en SN y SA. Para el sobrenadante, se

presentaron solamente diferencias significativas entre el control y el tratamiento sobre las células cultivadas bajo la concentración de nutrientes SA y las dos temperaturas empleadas en este estudio. De acuerdo con todo lo mencionado anteriormente, es notable que la condición de cultivo bajo la concentración de nutrientes SB en 25°C y 32°C, no favoreció a que el tratamiento con el péptido tuviera algún efecto.

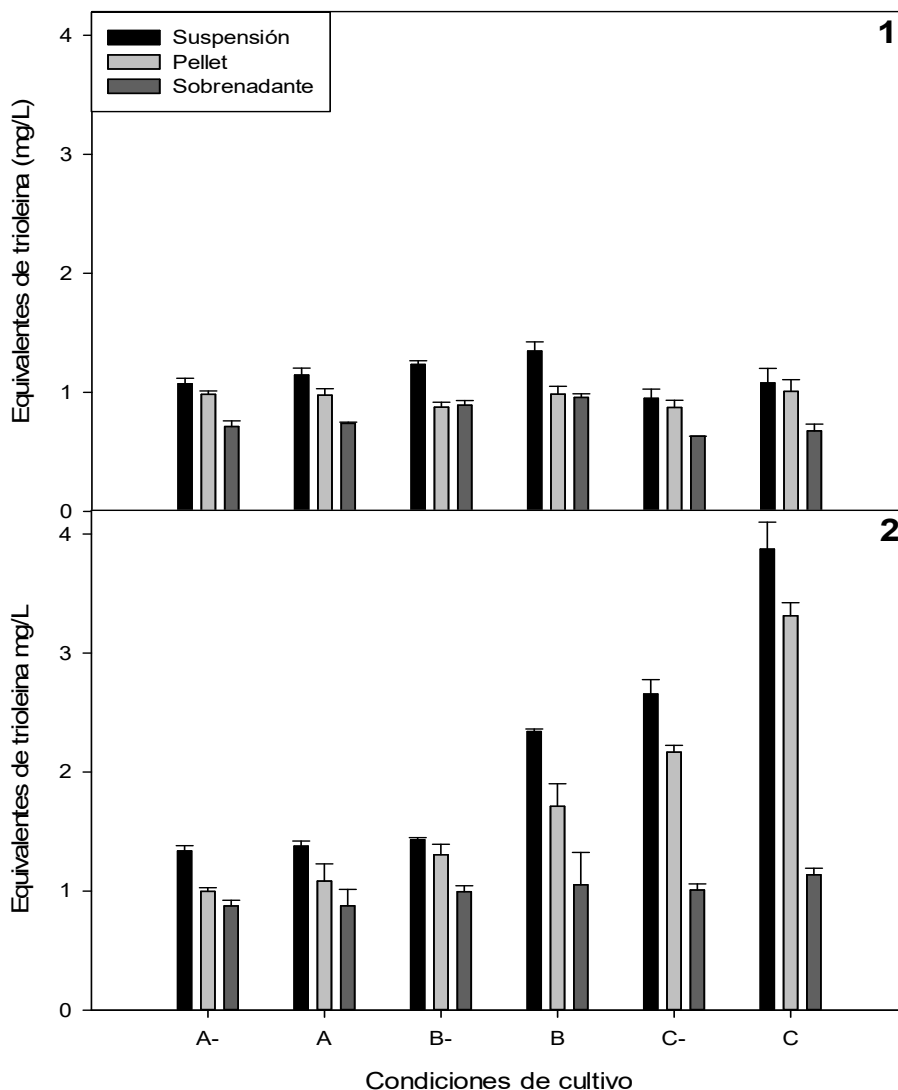


Figura 15. Representación cuantitativa del efecto de la melitina sobre la liberación de lípidos de la microalga *N. oleoabundans* cultivada a 1. 25°C y 2. 32°C. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: A: SB-N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: SN- N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: SA-N 14.71mM, P 6.42mM. En donde (-) indica el control negativo. Los valores se presentan en equivalentes de trioleína. Los datos presentados son las medias y las desviaciones estándar de las tres repeticiones. $P < 0.05$. (Prueba T-student).

Porcentaje de disrupción celular de la melitina sobre la microalga *N. oleoabundans*.

Los resultados del porcentaje de disrupción celular de la melitina sobre la microalga *N. oleoabundans* se muestran en la Figura 16, en donde al ser analizados mediante un análisis de varianza se demostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de disrupción celular con el tratamiento del péptido sobre las células cultivadas a 25°C y 32° C y a las diferentes concentraciones de nutrientes.; sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron bajo las condiciones de cultivo de 32° (barra gris) y la condición de cultivo SA en donde se obtuvo un 83.6% de disrupción celular.

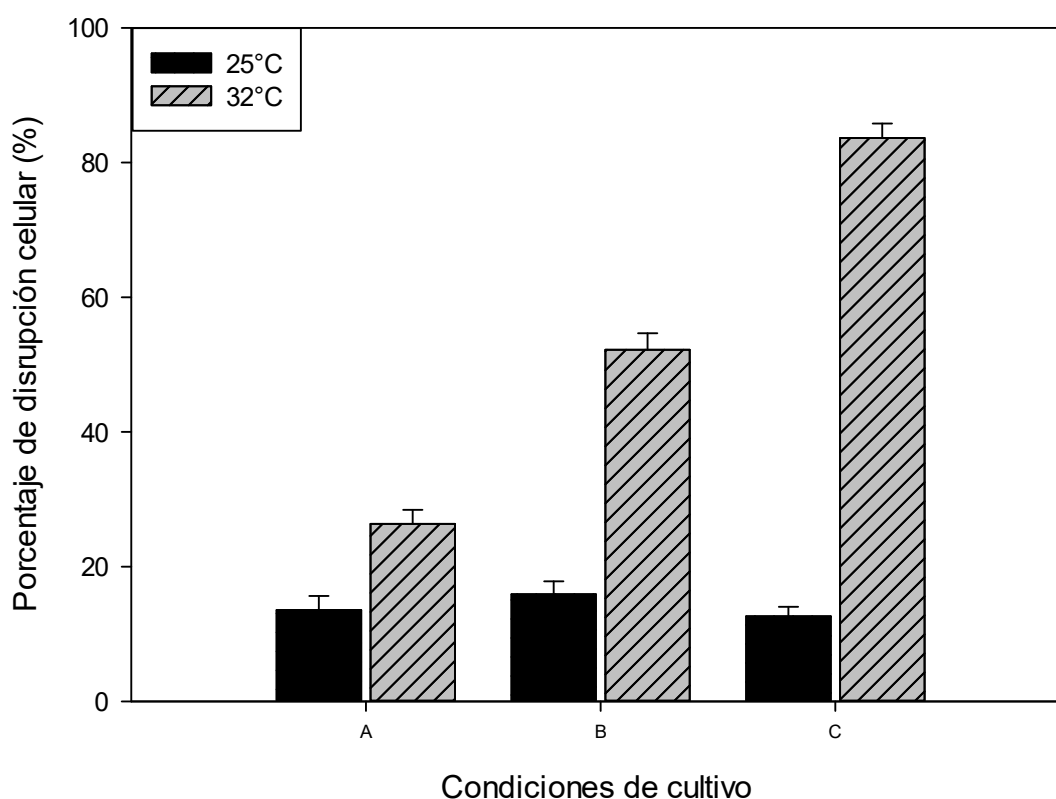


Figura 16. Efecto del tratamiento de melitina 10 µg /ml sobre el porcentaje de disrupción celular de la microalga *N. oleoabundans* cultivada a 25°C (barra negra) y 32° (barra gris). El medio de cultivo contenía A: N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: N 14.71mM, P 6.42mM. Los datos presentados son las medias y las desviaciones estándar de las tres repeticiones realizadas. $P < 0.05$. (Anova).

Al observar un comportamiento repetitivo en los resultados del posible efecto del tratamiento con el péptido melitina a 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre la microalga cultivada a 32° y a la concentración de nutrientes SA, se procedió a realizar la continuación de los siguientes análisis únicamente bajo dicha condición debido a que es la única que presentó el mayor efecto del tratamiento.

Extracción con solventes potenciada con el péptido melitina para la obtención de lípidos.

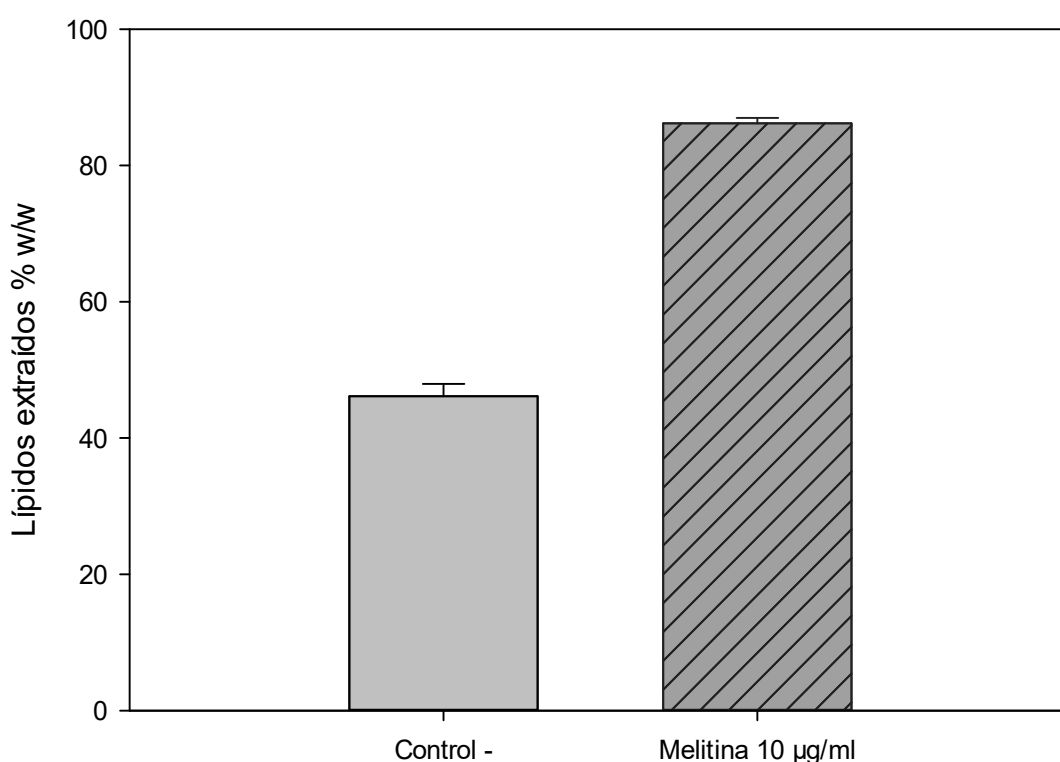


Figura 17. Efecto de melitina 10 $\mu\text{g/ml}$ en la extracción de lípidos neutros de la microalga *N. oleoabundans* cultivada a 32° C y a concentración de nutrientes SA. El experimento se realizó por triplicado en experimentos independientes. La extracción del control- se realizó en ausencia de melitina. Los datos mostrados son el promedio y las desviaciones estándar de las tres repeticiones realizadas. $P < 0.05$. (Prueba T-student).

Con base al objetivo general del estudio, para mejorar la recuperación de lípidos mediante un pretratamiento, se realizó el experimento de extracción lípidos por medio de solventes

a las microalgas cultivadas a 32°C y SA, en el cual, se analizó la comparación de la cantidad de lípidos obtenidos de dichas células incubadas en presencia y ausencia del péptido melitina como pretratamiento. La cantidad de lípidos fue cuantificada y según el análisis estadístico utilizado (anexo), los resultados mostraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento, mostrando cerca de 85% w/w de lípidos en la muestra, lo que representó el doble, en contraste con el control (Figura 17).

Observación del efecto del pretratamiento sobre la morfología celular de la microalga *N. oleoabundans*.

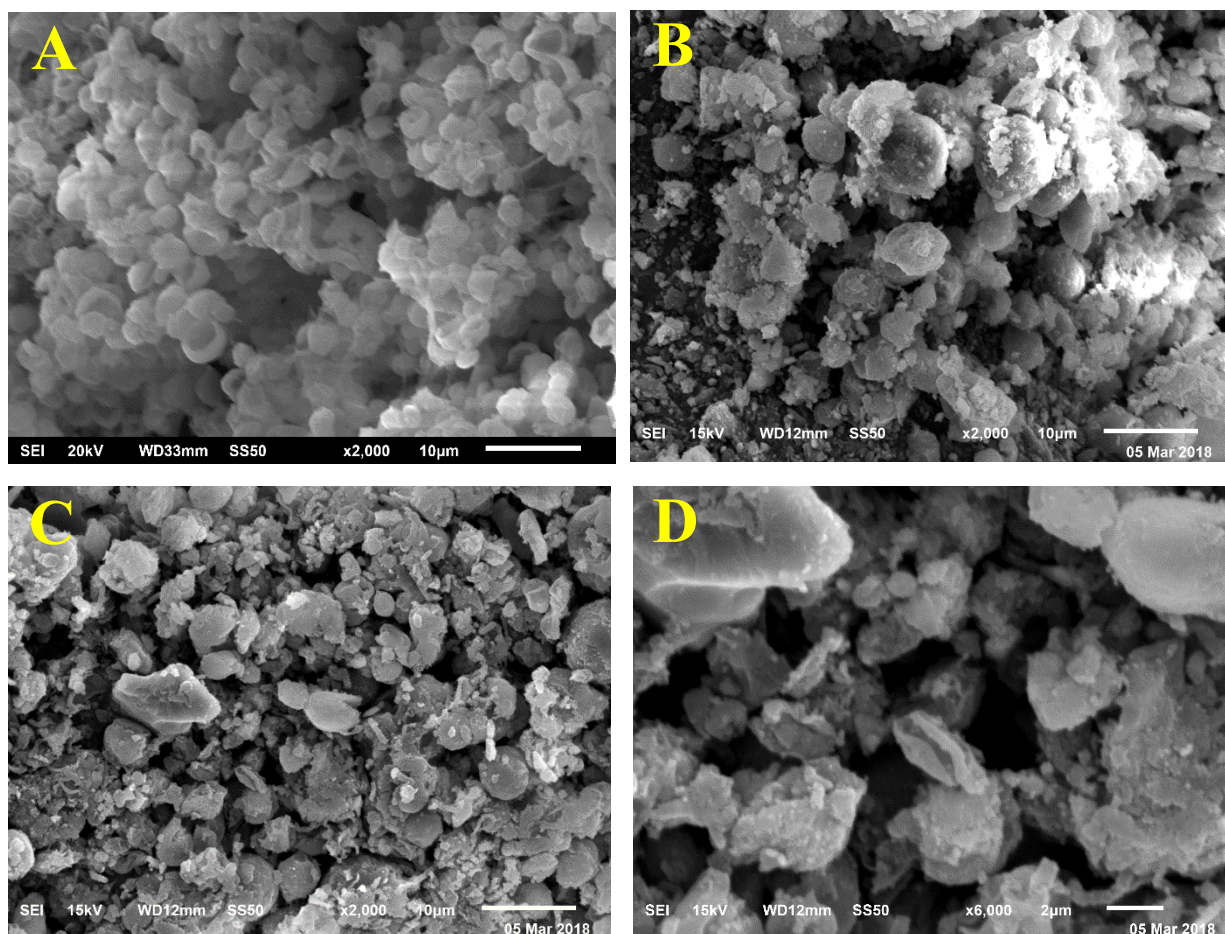


Figura 18. Micrografías de *N. oleoabundans* cultivada bajo 32° C y SA como concentración de nutrientes; las preparaciones de las células fueron observadas en MEB. Donde A) células sin tratamiento a X2,000. B) y C) Melitina 10 µg/ml a X2,000. D) Melitina 10 µg/ml a X6,000.

La microscopia electrónica de barrido se empleó para analizar los efectos del tratamiento con el péptido melitina sobre la morfología de las células de la microalga. En la Figura 18. B, C, D se muestran cambios evidentes en la morfología, lo cual indica un daño celular extensivo mostrando formas irregulares, en contraste con la Figura 18A, en donde se presentan las células sin algún tratamiento, las cuales presentaron una forma regular entre todas las células de los campos que se observaron.

Las células de la microalga cultivada bajo la condición de 32°C fueron observadas bajo microscopia de campo claro, fluorescencia y microscopia confocal. En la Figura 19 incisos A y C, se presentan las micrografías obtenidas de la microscopia de campo claro, en donde muestran las células sin tratamiento y bajo el tratamiento con el péptido melitina, respectivamente. Bajo esta técnica de microscopia mencionada, se logró observar una morfología esférica y regular en las células que fungieron como el control, mientras que lo contrario ocurrió en las células de la microalga a las que se les aplicó el tratamiento con el péptido, en donde se observaron formas aglomeradas e irregulares. Posteriormente, bajo las mismas condiciones se analizaron las células, pero con microscopia de fluorescencia, en donde B. y D. son el control y el tratamiento respectivamente; en este caso, se observaron las mismas características en las células que en la técnica de microscopia anterior, pero en esta técnica, las células se mostraron con una coloración roja, tal emisión es originada por la auto fluorescencia causada por la clorofila. La sonda fluorescente Rojo Nilo fue usada como colorante para la visualización de los cuerpos lipídicos que pudieran estar en las células de las microalgas. En las micrografías obtenidas con la técnica de microscopia confocal, en donde E. representa el control-, es decir, las células sin el tratamiento con el péptido melitina, y se pueden observar de manera clara, células con morfología esférica en las cuales el color verde representan los cuerpos lipídicos presentes y el color rojo representa la auto fluorescencia de la clorofila. En el inciso F de la Figura 19 se presenta la micrografía de las células de microalgas tratadas con el péptido melitina; si bien se presentaron aparentes cuerpos lipídicos teñidos de color verde y algunas zonas de color rojo, no se observaron las mismas formas esféricas, sino material aglomerado en todos los campos observados y algunas formas irregulares.

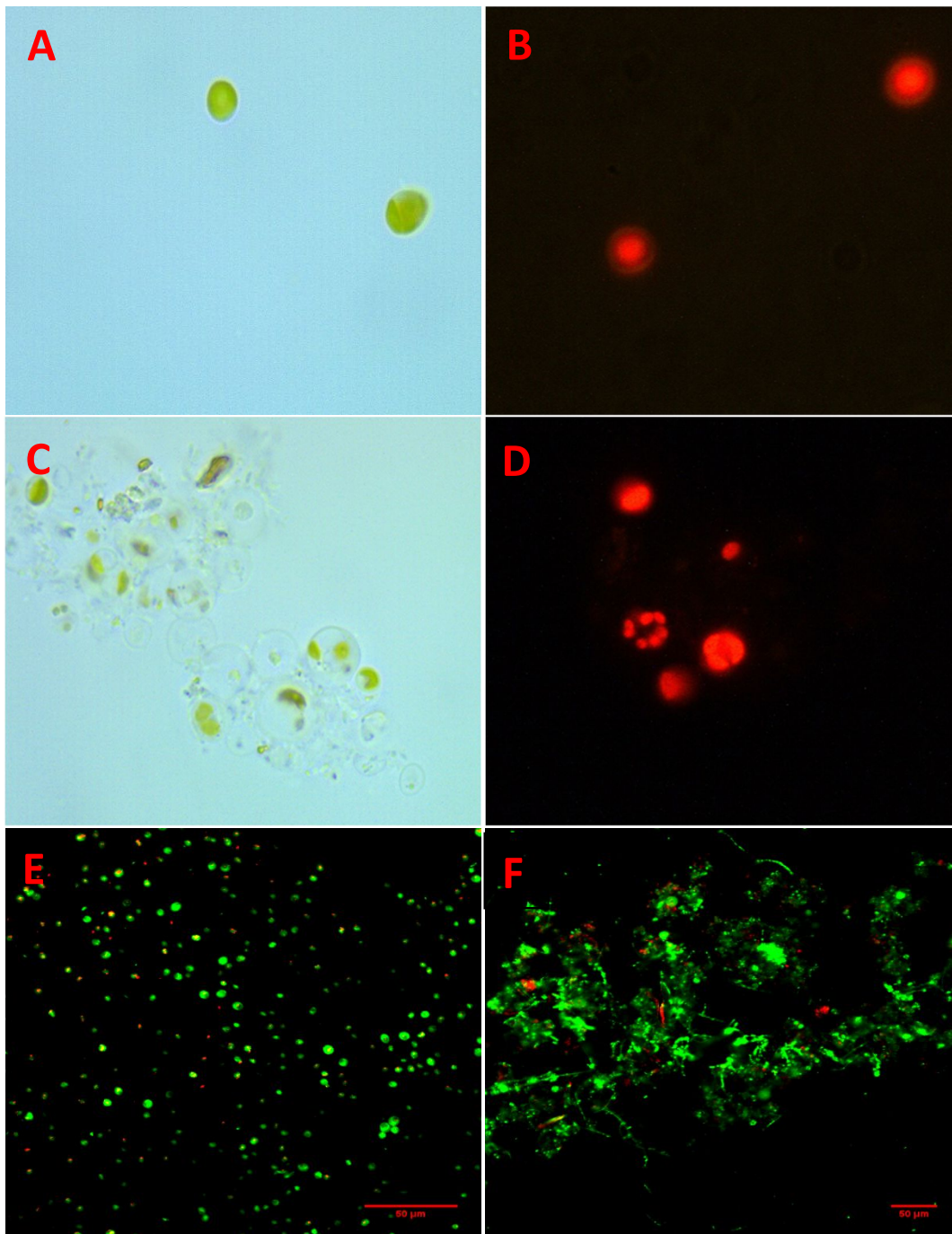


Figura 19. Estudio del contenido lipídico de la microalga *N. oleoabundans*. A y C. Microscopia de campo claro, donde A es el control- y C corresponde al tratamiento. B y D. Microscopia de fluorescencia, donde B es el control- y D corresponde a las células con tratamiento. Ambas microscopias se presentan con un aumento de 100x. E y F. Microscopia confocal, donde E es el control- y F corresponde a las células con tratamiento. Se usó la soda Rojo Nilo para la visualización de los lípidos (verde fluorescente). Se muestra auto fluorescencia de la clorofila en color rojo. La excitación fue de 595nm y la emisión de 615nm a un aumento de 60X y con un zoom digital Z.

DISCUSIÓN

Hasta la fecha, la producción de biocombustibles a partir de microalgas representa una opción factible, sin embargo, continúan existiendo limitantes que impiden que el proceso lo sea completamente. Las condiciones de cultivo en las que los lípidos de las microalgas son producidos de manera óptima resultan ser uno de los elementos clave, sin embargo, la elección de la especie de microalga es otro elemento clave en el proceso de producción debido a que se ha demostrado que no todas las especies responden de igual manera a la inducción de lípidos mediante deficiencias o excesos de ciertos nutrientes en el medio. Además, debido a la diversidad de las microalgas, existen diferencias entre ellas en sus estructuras, por ejemplo, la composición de la pared celular de cada especie de microalga es distinta, por lo tanto, hace que sea una limitante para la eficiencia del proceso de obtención de lípidos. Debido a la falta de información detallada de las diferencias o modificaciones causadas por las diferentes condiciones de cultivo sobre la pared celular de las microalgas, en esta investigación fue necesario hacer un escrutinio que fuera sencillo y rápido, que permitiera realizar un mayor número de evaluaciones para encontrar la condición óptima que permitiera la disrupción celular como pretratamiento mediante el péptido melitina. De los resultados obtenidos, fue relevante el hecho de que se presentara un efecto significativo sobre la cantidad de lípidos obtenidos bajo las condiciones de cultivo de la microalga a una temperatura de 32°C y altas concentraciones de nutrientes, contrastado con todas las demás condiciones probadas en las que el péptido melitina no tuvo un efecto significativo o resultó poco favorecedor; por lo tanto, se considera que este comportamiento ocurre por lo que se mencionaba anteriormente acerca de las diferencias que existen en la pared celular de las microalgas a diferentes condiciones de cultivo.

Se ha demostrado que la medición de fluorescencia con Rojo Nilo resulta ser una técnica adecuada para una amplia variedad de especies de microalgas además de que es una técnica relativamente sencilla y rápida, en la que no se tiene que realizar extracción de lípidos y se puede realizar *in vivo* (Held y Raymond 2011) (Halim y Webley 2015)(Bertozzini et al. 2011). Mediante dicha técnica se analizó la suspensión, pellet y sobrenadante, con la finalidad de determinar si existía efecto del péptido a través de la observación del incremento de la intensidad de fluorescencia con respecto al control. De acuerdo con los resultados observados, en la mayoría de los casos, la suma del contenido

de lípidos en pellet y sobrenadante fue muy similar con respecto al control indicando que no tuvo efecto significativo del tratamiento con el péptido, sin embargo, en algunos casos se mostró un incremento, lo que puede ser causa del efecto del péptido sobre el rompimiento en la célula, permitiendo una mayor interacción de la sonda Rojo Nilo con los lípidos y a consecuencia una mayor intensidad de fluorescencia; sin embargo, no se consideró dicho análisis como la prueba adecuada para cuantificar dicho efecto porque en ocasiones, la técnica puede fallar para una detección adecuada debido a que la fluorescencia del Rojo Nilo está influenciada por la temperatura y la duración de la tinción, cuando se aplican altas temperaturas o largos periodos de tinción, se ocasiona un quenchamiento de la fluorescencia (Deye et al. 1990). Además, el método pudiera desestimar o subestimar el contenido de lípidos, lo cual también depende de las características de las cepas de algas, particularmente la composición de la pared celular, como también las concentraciones de clorofila, lípidos polares de membrana y varios compuestos lipofílicos en la célula (Chen et al. 2009a). El mismo autor en otro estudio (Chen et al. 2009b) propone un método modificado en el cual se utiliza una especie de pretratamiento a las células con DMSO, haciendo que el método sea más confiable para la cuantificación *in vivo* de las microalgas de diferentes familias; no obstante, dicho método pudiera interferir con la finalidad de esta investigación.

De acuerdo al método empleado por (Bertozzini et al. 2011), se correlacionó la fluorescencia resultante a una longitud de emisión óptima (580nm) con el contenido de lípidos volumétrico para generar una curva de calibración del estándar trioleína, que fue de utilidad para la cuantificación de los lípidos; dicho método no requiere extracciones o purificaciones de lípidos, además de que puede permitir la detección de lípidos incluso a muy bajas concentraciones dando resultados confiables en unos minutos y se requiere poca cantidad de cultivo; tales beneficios resultaron de gran utilidad para la investigación debido a que realizar las extracciones de lípidos para cuantificar requiere de gran cantidad de cultivo, por ende el límite de detección de lípidos tiene que ser mucho mayor, además de gran cantidad de tiempo. En la cuantificación de la cantidad de lípidos del control, se observan diferencias notorias entre las diferentes condiciones de cultivo, este fenómeno se encuentra ampliamente reportado y es causado por el estrés en la célula, el cual se induce mediante deficiencias y excesos de nutrientes como nitrógeno y fósforo, intensidad

lumínica, temperatura, y pH afectan la producción de lípidos (Yao et al. 2012). Debido a que el macronutriente más importante es el nitrógeno (Minhas et al. 2016)(Sibi et al. 2016); en esta investigación se probaron deficiencias y excesos de dicho elemento, además de fosfatos, así como las temperaturas de 25° y 32°C. La escases de nitrógeno en el medio es una técnicas ampliamente reportada para la inducción de lípidos en microalgas (Liu et al. 2016)(Held y Raymond 2011) sin embargo en el caso de las condiciones de cultivo que favorecieron a *N. oleoabundans* en esta investigación fue la de exceso de nutrientes y la intensidad lumínica utilizada de 390 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ la cual es considerada como alta , este fenómeno coincide con lo reportado por (Xiao et al. 2015), en donde concluye que la intensidad de luz alta combinado con altas concentraciones de nutrientes tienen un efecto sinérgico y positivo en la producción de lípidos. Después del pretratamiento, la condición de cultivo que presentó más cantidad de lípidos en suspensión y sobrenadante resultó ser también la misma mencionada anteriormente, mientras que las células cultivadas a concentraciones bajas de nitratos y fosfatos no respondieron al tratamiento con el péptido lo cual puede deberse a que esta condición hace que la pared celular sea más rígida, lo cual coincide con lo reportado por (Yap et al. 2016) en donde menciona que ocurre un incremento de la rigidez de la pared celular de la microalga cuando hay bajas concentraciones de nitrógeno en el medio. En el caso de lo ocurrido en la cantidad de lípidos de la suspensión puede indicar una mayor interacción de la sonda Rojo Nilo con los lípidos después del tratamiento mientras que en el sobrenadante indica una liberación de dichos lípidos; debido a lo anterior, en cierta etapa del estudio se tomó la decisión de seguir trabajando en posteriores análisis con las células cultivadas bajo dicha condición. Sin embargo, estas condiciones de altas temperaturas y altas concentración pueden representar una adición al proceso y habría que analizar si es económicamente costeable.

En lo que respecta a los tipos de tratamientos previamente utilizados, muchos investigadores se han enfocado en diferentes estrategias como lo son los procesos químicos (W. C. Huang y Kim 2017; Steriti et al. 2014; Wu et al. 2017; Zuorro et al. 2016), físicos (Abdul Razack 2016; Lee et al. 2015; Skorupskaite et al. 2017; M. Wang y Yuan 2014; Yap et al. 2014) y biológicos (L. Yang et al. 2012; Q. Yang et al. 2015), en los cuales influye el tiempo de interacción, la concentración o la intensidad del tratamiento. En lo que respecta al tiempo, por ejemplo, en una investigación se aplicó un

tratamiento enzimático y se observó que resultó óptimo un tiempo de incubación de 2 horas (Horst et al. 2012), mientras que mediante un pretratamiento de H₂O₂ con un tiempo de contacto de 4 minutos se obtuvo un valor de lípidos máximo de 9.2% w/wt (Steriti et al. 2014), por lo tanto, el efecto que se obtuvo con el péptido melitina en esta investigación bajo el tiempo de 30 min que resulta ser aceptable.

En referencia a los resultados obtenidos de la evaluación del porcentaje de disrupción celular se observa que en todas las condiciones hubo cierto porcentaje de disrupción celular, a pesar de que en experimentos previos no se demuestra efecto del tratamiento bajo la mayoría de las condiciones de cultivo, esto puede explicarse por el tipo de técnica empleada en la determinación, que consiste en el conteo directo de células que permanecen intactas entonces este conteo depende del criterio de la persona que realiza el conteo, además de los restos celulares que puedan encontrarse de manera natural en la muestra. Anteriormente ya se han probado diferentes pretratamientos para generar disrupción celular particularmente en la microalga *N. oleoabundans*, por ejemplo, en un estudio anterior (D. Wang et al. 2015) se probó la disrupción celular en dicha microalga bajo sonicación a 800W durante 30 minutos obteniendo un grado de disrupción del 6%, mientras que mediante homogenización a alta presión mediante 60MPa se incrementó el grado de disrupción a 35.3 %, mediante la enzima celulasa se logró hasta un 64%, sin embargo, el proceso combinado de los tratamientos anteriores causó un 92.6% de disrupción celular de la microalga; contrastando lo anterior con los resultados obtenidos en esta investigación, en donde el mayor grado de disrupción celular por el péptido melitina durante 30 minutos fue de 83.6 % en las células cultivadas a 32°C y SA, se puede afirmar que este valor resulta mayor que los reportados por (D. Wang et al. 2015) en el proceso individual, sin embargo, el porcentaje obtenido en el proceso combinado es mayor que el obtenido en esta investigación; como alternativa, se pudiera igualar o superar dicho porcentaje mediante la combinación del tratamiento del péptido melitina con un método físico, pero esto puede generar más costos o dificultades en el proceso.

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación del grado de disrupción celular, se seleccionó la mejor condición en donde se presentó mayor porcentaje de disrupción y se realizó un análisis típico de lípidos, el cual se basa en el uso de separación de fases

mediante solventes, en donde se requieren considerables cantidades de material biológico y solventes orgánicos, además de otras manipulaciones para lograr la cuantificación (Chen et al. 2009), debido a esto es que se decidió aplicarlo solamente a la condición de 32°C obteniendo un 86% w/w de lípidos, lo cual supera al porcentaje reportado por (C. Wu et al. 2017), pero queda por debajo a lo reportado por (Bielsa et al. 2016; C. Wu et al. 2017) aunque muy cerca de los porcentajes; lo anterior puede ser debido a las diferencias en las aplicaciones de los pretratamientos y los diferentes tipos de solventes empleados en la extracción.

En el análisis microscópico, se realizaron tinciones de las células sin tratamiento y con el tratamiento del péptido melitina mediante la sonda fluorescente Rojo Nilo, la cual se usa ampliamente para la identificación de microalgas que acumulan lípidos (Bertozzini et al. 2011; Cooper et al. 2010; Greenspan y Fowler 1985; G. H. Huang, Chen, y Chen 2009; Wang et al. 2016); las imágenes confocales muestran los cuerpos lipídicos en color verde y en las células que no se les aplicó tratamiento se observan formas esféricas y regulares en contraste con las células que se les aplicó tratamiento que ocurrió todo lo contrario, este fenómeno confirma que el péptido melitina si causa un rompimiento y con esto la liberación del material intracelular .

El análisis de las células en el microscopio electrónico de barrido permite observar estructuras en mayores magnificaciones, debido a esto, se pueden diferenciar cambios antes y después de un tratamiento de rompimiento en la estructura celular. En este caso, las células a las que no se les aplicó el tratamiento con el péptido presentaron una forma esférica y aparentemente intacta, mientras que cuando se aplicó el tratamiento, se observaron células rotas o restos celulares. El análisis de SEM es consistente de acuerdo con los resultados observados en el reporte de (Karthikeyan y Prathima 2017) en donde se demuestran visualmente la degradación completa de la pared celular de *N. oleoabundans* después de un pretratamiento.

La celulosa es uno de los principales componentes de la pared celular de *N. oleoabundans* (Chantanachat y Bold 1962), por lo tanto, la actividad celulolítica debería ser efectiva para romper a las células, otros autores (Rashidi y Trindade 2018) mencionan que la pared celular de *N. oleoabundans* está compuesta principalmente por 24.3 % de carbohidratos,

31.5% proteínas, 22.2 % lípidos y un 7.8% de material inorgánico, dicha composición es muy similar a la pared celular de las plantas terrestres en donde los carbohidratos son el principal componente. De acuerdo con lo anterior, el posible mecanismo de acción del péptido sobre la microalga pudiera ocurrir de la siguiente manera: La melitina se encuentra solubilizada en el medio acuoso en forma de monómero y se encuentra con la célula para penetrar la envoltura celular, después los monómeros son oligomerizados para formar estructuras formadoras de poro, dicha formación conduce a la perturbación de la homeostasis y con esto ocurre la lisis. Este mecanismo propuesto coincide con lo reportado por (Kataev et al. 2012) en donde evaluaron el efecto de toxinas peptídicas provenientes de *Bacillus cereus*. Otras investigaciones mencionan que para reducir las floraciones algales utilizaron el péptido α -helicoidal HP y sus análogos HPA3 y HPR3NT3, el efecto fue de reducción en la movilidad de las algas, la disrupción de su membrana plasmática y la liberación de los componentes intracelulares. El mecanismo que proponen es que el péptido actúa sobre la célula mediante formación de poros, lisando la membrana. El carácter anfipático permite que las moléculas actúen en la membrana por una actividad permeante, y así puedan unirse fácilmente a la membrana plasmática e insertarse en la bicapa lipídica (S. C. Park et al. 2011)(S.-C. Park et al. 2008) . De cualquier forma, es importante remarcar que los posibles mecanismos propuestos deberán ser confirmados mediante experimentos específicos.

Con relación a la dosis de melitina que se aplicó en este estudio que fue de 10 $\mu\text{g/ml}$, fue elegida de acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo 1 de esta investigación, además dicha dosis coincide con un reporte previo en donde se presentó un efecto tóxico de casi el 100% en la reducción de su crecimiento, en donde se analizaron los efectos biológicos del péptido melitina sobre la microalga unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata*, con la finalidad de evaluar la toxicidad cuando se le da un uso terapéutico en medicina a dicho péptido (Galdiero et al. 2015).

Mediante esta investigación se probó que el péptido melitina puede causar disrupción celular a un alto porcentaje y con una cantidad aceptable de recuperación de lípidos, por lo tanto, el siguiente paso sería realizar una evaluación económica de esta técnica para ver si es realmente viable en comparación con otras técnicas. De cualquier manera, una

estrategia para reciclar el péptido melitina, puede ser inmovilizarla en un soporte en el cual se podrían hacer pasar los cultivos de microalgas para que exista la interacción necesaria con el péptido. Esta opción debe ser explorada debido a que la melitina presenta buena estabilidad y mantiene su efecto en un amplio rango de temperaturas (Faucon et al. 1979). Otra estrategia podría ser el uso de ingeniería genética en la microalga para que exprese el péptido melitina. Se ha realizado la estrategia mencionada anteriormente pero en la levadura *Kluyveromyces lactis* para que exprese melitina (Husseneder et al. 2016).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos bajo las condiciones desarrolladas de esta investigación y considerando la discusión de esta, se derivan las siguientes conclusiones:

- ❖ La melitina tiene la propiedad intrínseca de insertarse a monocapas realizadas con los principales galactolípidos MGDG y DGDG presentes en la pared celular de las microalgas.
- ❖ De las diferentes condiciones de cultivo aplicadas a la microalga, se encontró que la que producía una mayor cantidad de lípidos fue la realizada a 32°C y exceso de nutrientes (nitratos a 14.71mM y fosfatos a 6.42mM).
- ❖ Se probó la técnica de disrupción celular basada en el uso del péptido melitina a 10µg/ml durante 30 minutos sobre microalga *N. oleoabundans* cultivada a diferentes condiciones en las cuales se presentó diferencia significativa en la cantidad de lípidos con respecto al control en la suspensión de las células cultivadas a 32°C y exceso de nutrientes (nitratos a 14.71mM y fosfatos a 6.42mM) y en 32°C nitratos 2.94mM y fosfatos 1.29mM.
- ❖ Al evaluar el sobrenadante de las células cultivadas a diferentes condiciones y tratadas con el péptido melitina, se observó diferencia significativa en la cantidad de lípidos con respecto al control en la condición de 32° y concentraciones de nitratos a 14.71mM y fosfatos a 6.42mM, demostrando una liberación de dichos lípidos.
- ❖ Existe un efecto a nivel celular del tratamiento con el péptido melitina sobre la microalga *N. oleoabundans* confirmado mediante la determinación del porcentaje de disrupción celular, siendo 83.6% el más alto y fue dado por la condición de cultivo a 32°C y concentraciones de nitratos a 14.71mM y fosfatos a 6.42 mM. También las técnicas de microscopia empleadas confirman dicho efecto bajo la condición mencionada, presentándose diferencias morfológicas entre el control y el tratamiento.

- ❖ Se potenció la extracción de los lípidos de la microalga *N. oleoabundans* mediante el rompimiento celular con el péptido melitina mostrándose un incremento del doble en el % w/w con respecto al control.
- ❖ Fue de gran relevancia analizar el efecto del péptido bajo las diferentes condiciones de cultivo debido a que no se presentó el mismo efecto en todas las que se probaron debido a los posibles cambios en la pared celular de la célula, lo que hace que se modifique su permeabilidad.
- ❖ El uso del pretratamiento con el péptido melitina ofrece una opción prometedora para potenciar la obtención de lípidos de las microalgas, sin embargo, esta técnica se encuentra aún poco explorada y aparenta ser selectiva con las diferentes condiciones de cultivo de las microalgas, además que es necesario realizar futuras evaluaciones para ver si el proceso resulta escalable.

PERSPECTIVAS

A partir de la información presentada en esta investigación, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en varias direcciones.

En un primer plano se encuentra el hacer económicamente factible el proceso, dentro de las posibles estrategias se encuentra la fijación del péptido en una matriz para que entre en contacto directo con el cultivo y cause la disrupción, lo cual permitiría la reutilización del péptido. Otra estrategia que valdría la pena analizar, es la modificación genética de la microalga para que en cierta fase pudiera expresar el péptido y con esto causar una disrupción celular. También es de gran importancia el probar el efecto con otras cepas y a su vez diferentes condiciones de cultivo, debido por la aparente selectividad del péptido para efectuar el rompimiento. Otro aspecto que sería importante analizar si un excesivo tiempo de interacción del péptido con la microalga pudiera causar una degradación de los lípidos. Finalmente se pudiera analizar la acción de un pretratamiento combinado, ya sea físico o biológico para incrementar el efecto o inclusive para provocarlo en donde no se haya presentado por las diferencias en la pared celular.

BIBLIOGRAFÍA

Amaya A, & Sarmiento R. 2010. Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas con etanol-hexano empleando disrupción celular térmica y química. Universidad Industrial de Santander.

Abdul Razack, Sirajunnisa, Surendhiran Duraierasan, and Vijay Mani. 2016. "Biosynthesis of Silver Nanoparticle and Its Application in Cell Wall Disruption to Release Carbohydrate and Lipid from *C. Vulgaris* for Biofuel Production." *Biotechnology Reports* 11: 70–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2016.07.001>.

Abo-Shady, A. M., Y. A. Mohamed, and T. Lasheen. 1993. "Chemical Composition of the Cell Wall in Some Green Algae Species." *Biologia Plantarum* 35(4): 629–32.

Baldisserotto, Costanza, Martina Giovanardi, Lorenzo Ferroni, and Simonetta Pancaldi. 2014. "Growth, Morphology and Photosynthetic Responses of *Neochloris Oleoabundans* during Cultivation in a Mixotrophic Brackish Medium and Subsequent Starvation." *Acta Physiologiae Plantarum* 36(2): 461–72. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1426-3>.

Baudelet, Paul-hubert, Guillaume Ricochon, Michel Linder, and Lionel Muniglia. 2017. "Review Article A New Insight into Cell Walls of Chlorophyta." *Algal Research* 25(June): 333–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.008>.

Bertozzini, Elena, Luca Galluzzi, Antonella Penna, and Mauro Magnani. 2011. "Application of the Standard Addition Method for the Absolute Quantification of Neutral Lipids in Microalgae Using Nile Red." *Journal of Microbiological Methods* 87(1): 17–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.018>.

Bielsa, Guadalupe Barnech et al. 2016. "Simultaneous Production Assessment of Triacylglycerols for Biodiesel and Exopolysaccharides as Valuable Co-Products in *Navicula Cincta*." *Algal Research* 15: 120–28.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926416300248>.

Bligh, E.G, and W.J Dyer. 1959. "A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION." *Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8): 911–17.

Blumreisinger, Maria et al. 1983. "CELL WALL COMPOSITION OF CHLOROCOCCAL ALGAE." 22(7): 1603–4.

Bottier, C. et al. 2007. "Galactosyl Headgroup Interactions Control the Molecular Packing of Wheat Lipids in Langmuir Films and in Hydrated Liquid-Crystalline Mesophases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768(6): 1526–40. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273607000685>.

BROCKMAN, H. 1999. "Lipid Monolayers: Why Use Half a Membrane to Characterize Protein-Membrane Interactions?" *Current Opinion in Structural Biology* 9(4): 438–43. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X9980061X>.

Chantanachat, S., Bold, H.C. 1962. "Physiological Studies II. Some Algae From Arid Solid." *The University of texas Publication* 6218(6218): 73.

Chen, Wei et al. 2009. "A High Throughput Nile Red Method for Quantitative Measurement of Neutral Lipids in Microalgae." *Journal of Microbiological Methods* 77(1): 41–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001>.

Cooper, Mark Scott, William Robert Hardin, Timothy Wayne Petersen, and Rose Ann Cattolico. 2010. "Visualizing 'Green Oil' in Live Algal Cells." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109(2): 198–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.08.004>.

Davis, Ryan W. et al. 2012. "Multiplex Fluorometric Assessment of Nutrient Limitation as a Strategy for Enhanced Lipid Enrichment and Harvesting of *Neochloris Oleoabundans*." *Biotechnology and Bioengineering* 109(10): 2503–12.

Deng, Xiaodong, Xiaowen Fei, and Yajun Li. 2011. "The Effects of Nutritional Restriction on Neutral Lipid Accumulation in Chlamydomonas and Chlorella." *African Journal of Microbiology* ... 5(3): 260–70.

[http://www.academicjournals.org/AJMR/PDF/pdf2011/4Feb/Deng et al.pdf](http://www.academicjournals.org/AJMR/PDF/pdf2011/4Feb/Deng%20et%20al.pdf).

Deye, J.F., Berger, T.A., Anderson, A.G. 1990. "Nile Red as a Solvatochromic Dye for Measuring Solvent Strength in Normal Liquids and Mixtures of Normal Liquids with Supercritical and near Critical Fluid." *Analytical Chemistry* 62: 615–622.

Dong, Tao, Eric P. Knoshaug, Philip T. Pienkos, and Lieve M.L. Laurens. 2016. "Lipid Recovery from Wet Oleaginous Microbial Biomass for Biofuel Production: A Critical Review." *Applied Energy* 177: 879–95.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261916307772> (November 24, 2018).

Faucon, J F, J Dufourcq, and C Lussan. 1979. "THE SELF-ASSOCIATION OF MELITTIN AND ITS BINDING TO LIPIDS." *FEBS LETTERS* 102(1): 20–23.

Ferre, Rafael et al. 2009. "Synergistic Effects of the Membrane Actions of Cecropin-Melittin Antimicrobial Hybrid Peptide BP100." *Biophysical Journal* 96(5): 1815–27.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349509002306>.

Galdiero, Emilia et al. 2015. "Integrated Analysis of the Ecotoxicological and Genotoxic Effects of the Antimicrobial Peptide Melittin on Daphnia Magna and Pseudokirchneriella Subcapitata." *Environmental Pollution* 203: 145–52.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.046>.

Giovanardi, Martina et al. 2014. "Growth and Lipid Synthesis Promotion in Mixotrophic Neochloris Oleoabundans (Chlorophyta) Cultivated with Glucose." *Protoplasma* 251(1): 115–25.

Gonzalez-Horta, Azucena et al. 2017. “Biodegradable Nanoparticles Loaded with Tetrameric Melittin: Preparation and Membrane Disruption Evaluation.” *General physiology and biophysics* 36(04): 373–81.

http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=5358&category_id=132&option=com_virtuemart.

Gordillo, F. J L, M. Goutx, F. L. Figueroa, and F. X. Niell. 1998. “Effects of Light Intensity, CO₂ and Nitrogen Supply on Lipid Class Composition of *Dunaliella Viridis*.” *Journal of Applied Phycology* 10(2): 135–44.

Greenspan, Phillip, and Stanley D Fowler. 1985. “Spectrofluorometric Studies of the Lipid Probe, Nile Red.” *Journal of Lipid Research* 26(7): 781–89.

Günerken, E. et al. 2015. “Cell Disruption for Microalgae Biorefineries.” *Biotechnology Advances* 33(2): 243–60.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501500021X> (November 24, 2018).

Gzyl-Malcher, Barbara, Maria Filek, Katarzyna Makyła, and Maria Paluch. 2008. “Differences in Surface Behaviour of Galactolipoids Originating from Different Kind of Wheat Tissue Cultivated in Vitro.” *Chemistry and Physics of Lipids* 155(1): 24–30.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308408002934>.

Gzyl-Malcher, Barbara, Maria Zembala, and Maria Filek. 2010. “Effect of Tocopherol on Surface Properties of Plastid Lipids Originating from Wheat Calli Cultivated in Cadmium Presence.” *Chemistry and Physics of Lipids* 163(1): 74–81.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000930840900351X>.

Halim, Ronald, Michael K. Danquah, and Paul A. Webley. 2012. “Extraction of Oil from Microalgae for Biodiesel Production: A Review.” *Biotechnology Advances* 30(3):

709–32.

Halim, Ronald, Razif Harun, Michael K. Danquah, and Paul A. Webley. 2012. “Microalgal Cell Disruption for Biofuel Development.” *Applied Energy* 91(1): 116–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.048>.

Halim, Ronald, and Paul A. Webley. 2015. “Nile Red Staining for Oil Determination in Microalgal Cells: A New Insight through Statistical Modelling.” *International Journal of Chemical Engineering* 2015.

Hall, Kristopher, Tzong-Hsien Lee, and Marie-Isabel Aguilar. 2009. “The Role of Electrostatic Interactions in the Membrane Binding of Melittin.” *Journal of Molecular Recognition* 24(1): 108–18. <http://doi.wiley.com/10.1002/jmr.1032>.

He, Qiaoning, Haijian Yang, Lei Wu, and Chunxiang Hu. 2015. “Effect of Light Intensity on Physiological Changes, Carbon Allocation and Neutral Lipid Accumulation in Oleaginous Microalgae.” *Bioresource Technology* 191: 219–28. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415006859?via%3Dihub> (November 23, 2018).

Held, Paul, and Keri Raymond. 2011. “Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red.” *BioTek Application Note*: 1–5.

Horst, Irmtraud et al. 2012. “Treatment of *Phaeodactylum Tricornutum* Cells with Papain Facilitates Lipid Extraction.” *Journal of Biotechnology* 162(1): 40–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.033>.

Hoyo, Javier, Ester Gaus, and Juan Torrent-Burgués. 2016. “Monogalactosyldiacylglycerol and Digalactosyldiacylglycerol Role, Physical States, Applications and Biomimetic Monolayer Films.” *The European Physical Journal E* 39(3): 39. <http://link.springer.com/10.1140/epje/i2016-16039-0>.

- Hu, Qiang et al. 2008. "Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: Perspectives and Advances." *Plant Journal* 54(4): 621–39.
- Huang, Guan Hua, Gu Chen, and Feng Chen. 2009. "Rapid Screening Method for Lipid Production in Alga Based on Nile Red Fluorescence." *Biomass and Bioenergy* 33(10): 1386–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.05.022>.
- Huang, Wen Can, and Jong Duk Kim. 2017. "Simultaneous Cell Disruption and Lipid Extraction in a Microalgal Biomass Using a Nonpolar Tertiary Amine." *Bioresource Technology* 232: 142–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.037>.
- Husseneder, Claudia, Jennifer R. Donaldson, and Lane D. Foil. 2016. "Genetically Engineered Yeast Expressing a Lytic Peptide from Bee Venom (Melittin) Kills Symbiotic Protozoa in the Gut of Formosan Subterranean Termites" ed. Pedro L. Oliveira. *PLOS ONE* 11(3): e0151675. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0151675> (November 10, 2018).
- Jamasbi, Elaheh et al. 2014. "Melittin Peptides Exhibit Different Activity on Different Cells and Model Membranes." *Amino Acids* 46(12): 2759–66.
- Johansen, M.N. 2012. "Microalgae: Biotechnology, Microbiology, and Energy." *ova Science Publishers*:
- Kalisch, Barbara, Peter Dörmann, and Georg Hölzl. 2016. "DGDG and Glycolipids in Plants and Algae." In , 51–83. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25979-6_3.
- Karthikeyan, S., and A. Prathima. 2017. "Neochloris Oleoabundans Microalgae Oil as a Fuel for Diesel Engines." *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects* 39(6): 606–12. <http://dx.doi.org/10.1080/15567036.2016.1248800>.

- Kataev, Anatoly A., Zhanna I. Andreeva-Kovalevskaya, Alexander S. Solonin, and Vadim I. Ternovsky. 2012. "Bacillus Cereus Can Attack the Cell Membranes of the Alga Chara Corallina by Means of HlyII." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818(5):1235–41.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273612000144> (November 6, 2018).
- Lafleur, Michel et al. 1987. "Study of the Effect of Melittin on the Thermotropism of Dipalmitoylphosphatidylcholine by Raman Spectroscopy." *Biochemistry* 26(4): 1173–79. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00378a027>.
- Lafleur, Michel, Isabelle Samson, and Michel Pézolet. 1991. "Investigation of the Interaction between Melittin and Dipalmitoylphosphatidylglycerol Bilayers by Vibrational Spectroscopy." *Chemistry and Physics of Lipids* 59(3): 233–44.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009308491900235> (November 24, 2018).
- Lee, Andrew K., David M. Lewis, and Peter J. Ashman. 2015. "Microalgal Cell Disruption by Hydrodynamic Cavitation for the Production of Biofuels." *Journal of Applied Phycology* 27(5): 1881–89.
- Lee, Soo Youn, Jun Muk Cho, Yong Keun Chang, and You Kwan Oh. 2017. "Cell Disruption and Lipid Extraction for Microalgal Biorefineries: A Review." *Bioresource Technology* 244: 1317–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>.
- Li, Y.; Horsman, M.; Wang, B.; Wu, N.; Lan, C.Q. Effects. 2008. "Effects of Nitrogen Sources on Cell Growth and Lipid Accumulation of Green Alga *Neochloris Oleoabundans*." *Applied Microbiology and Biotechnology Microbiol. Biotechnol.*

Liu, Tingting, Yuqin Li, Fei Liu, and Chao Wang. 2016. "The Enhanced Lipid Accumulation in Oleaginous Microalga by the Potential Continuous Nitrogen-Limitation (CNL) Strategy." *Bioresource Technology* 203: 150–59.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241501651X?via%3Dihub> (November 12, 2018).

Minhas, Amritpreet K., Peter Hodgson, Colin J. Barrow, and Alok Adholeya. 2016. "A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids." *Frontiers in Microbiology* 7.

<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00546/abstract>.

Morales-Sánchez, Daniela, Raunel Tinoco-Valencia, Mario A. Caro-Bermúdez, and Alfredo Martinez. 2014. "Culturing *Neochloris Oleoabundans* Microalga in a Nitrogen-Limited, Heterotrophic Fed-Batch System to Enhance Lipid and Carbohydrate Accumulation." *Algal Research* 5: 61–69.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926414000496> (November 24, 2018).

Ningsih, Zubaidah et al. 2012. "Slow Insertion Kinetics during Interaction of a Model Antimicrobial Peptide with Unilamellar Phospholipid Vesicles." *Langmuir* 28(4): 2217–24. <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/la203770j>.

Pan, Jianjun, and Nawal K. Khadka. 2016. "Kinetic Defects Induced by Melittin in Model Lipid Membranes: A Solution Atomic Force Microscopy Study." *The Journal of Physical Chemistry B* 120(20): 4625–34.

<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.6b02332>.

Park, Seong-Cheol et al. 2008. "Amphipathic α -Helical Peptide, HP (2–20), and Its Analogues Derived from *Helicobacter Pylori*: Pore Formation Mechanism in Various Lipid Compositions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778(1): 229–41. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273607003811>

(November 6, 2018).

Park, Seong Cheol, Jong Kook Lee, Si Wouk Kim, and Yoonkyung Park. 2011. "Selective Algicidal Action of Peptides against Harmful Algal Bloom Species." *PLoS ONE* 6(10).

Plasencia, Ines, Kevin M.W. Keough, and Jesus Perez-Gil. 2005. "Interaction of the N-Terminal Segment of Pulmonary Surfactant Protein SP-C with Interfacial Phospholipid Films." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1713(2): 118–28.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273605001756>.

Rapson, Andrew C. et al. 2011. "Structural Dynamics of a Lytic Peptide Interacting with a Supported Lipid Bilayer." *Biophysical Journal* 100(5): 1353–61.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349511001093>.

Rashidi, Behzad, and Luisa M. Trindade. 2018. "Detailed Biochemical and Morphologic Characteristics of the Green Microalga *Neochloris Oleoabundans* Cell Wall." *Algal Research* 35: 152–59.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926418305125> (November 12, 2018).

Ravanal, María Cristina et al. 2016. "Comparison of Different Types of Pretreatment and Enzymatic Saccharification of *Macrocystis Pyrifera* for the Production of Biofuel." *Algal Research* 13: 141–47.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926415301132>.

Rawat, I, R R Kumar, T Mutanda, and F Bux. 2013. "Biodiesel from Microalgae: A Critical Evaluation from Laboratory to Large Scale Production." *Applied Energy* 103: 444–67.

Sessa, Grazia, John H Freer, and Gerald Weissmann. 1969. "MACROMOLECULES : With Lipid Membrane Systems Interaction of a Lytic Polypeptide , Lipid Membrane

Systems *.” 244(13).

Sharma, Kalpesh K., Holger Schuhmann, and Peer M. Schenk. 2012. “High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production.” *Energies* 5(5): 1532–53. <http://www.mdpi.com/1996-1073/5/5/1532>.

Sibi, G., Vishaka Shetty, and Keyuri Mokashi. 2016. “Enhanced Lipid Productivity Approaches in Microalgae as an Alternate for Fossil Fuels – A Review.” *Journal of the Energy Institute* 89(3): 330–34. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743967114204417?via%3Dihub> (November 12, 2018).

Sierra, Laura Soto, Chelsea K. Dixon, and Lisa R. Wilken. 2017. “Enzymatic Cell Disruption of the Microalgae *Chlamydomonas Reinhardtii* for Lipid and Protein Extraction.” *Algal Research* 25: 149–59. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926417303752> (June 2, 2017).

da Silva, Teresa Lopes et al. 2009. “Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159(2): 568–78. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8443-5>.

Skorupskaite, Virginija et al. 2017. “Green Algae *Ankistrodesmus Fusiformis* Cell Disruption Using Different Modes.” *Biomass and Bioenergy* 107(October): 311–16. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.10.015>.

Steriti, Alberto, Roberto Rossi, Alessandro Concas, and Giacomo Cao. 2014. “A Novel Cell Disruption Technique to Enhance Lipid Extraction from Microalgae.” *Bioresource Technology* 164: 70–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.056>.

Sun, Amy et al. 2011. “Comparative Cost Analysis of Algal Oil Production for

Biofuels.” *Energy* 36(8): 5169–79.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360544211003975>

Sun, Xian et al. 2014. “Effect of Nitrogen-Starvation, Light Intensity and Iron on Triacylglyceride/Carbohydrate Production and Fatty Acid Profile of *Neochloris Oleoabundans* HK-129 by a Two-Stage Process.” *Bioresource Technology* 155: 204–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.109>.

Tornabene, T.; Holzer, G.; Lien, S.; Burris, N. 1983. “Lipid Composition of the Nitrogen Starved Green Alga *Neochloris Oleoabundans*.” *Enzyme Microb. Technol.*

Uduman, Nyomi et al. 2010. “Dewatering of Microalgal Cultures: A Major Bottleneck to Algae-Based Fuels.” *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 2(1): 012701. <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3294480>.

Vogel, H., and F. Jähnig. 1986. “The Structure of Melittin in Membranes.” *Biophysical Journal* 50(4): 573–82. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000634958683497X>.

Wang, Bei, and Christopher Q. Lan. 2011. “Biomass Production and Nitrogen and Phosphorus Removal by the Green Alga *Neochloris Oleoabundans* in Simulated Wastewater and Secondary Municipal Wastewater Effluent.” *Bioresource Technology* 102(10):5639–44.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411002392> (November 24, 2018).

Wang, Dongqin et al. 2015. “Combined Enzymatic and Mechanical Cell Disruption and Lipid Extraction of Green Alga *Neochloris Oleoabundans*.” *International Journal of Molecular Sciences* 16(4): 7707–22.

Wang, M., and W. Yuan. 2014. “Microalgal Cell Disruption via Ultrasonic Nozzle Spraying.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(2): 1111–22.

Wang, Yong Zhong et al. 2016. “Growth and Lipid Accumulation of Indigenous Algal Strains under Photoautotrophic and Mixotrophic Modes at Low Temperature.” *Algal Research* 16: 195–200.

Wu, Chongchong, Ye Xiao, Weiguo Lin, Jiaquan Li, et al. 2017. “Aqueous Enzymatic Process for Cell Wall Degradation and Lipid Extraction from *Nannochloropsis* Sp.” *Bioresource Technology* 223: 312–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.063>.

Wu, Chongchong, Ye Xiao, Weiguo Lin, Junying Zhu, et al. 2017. “Surfactants Assist in Lipid Extraction from Wet *Nannochloropsis* Sp.” *Bioresource Technology* 243: 793–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.010>.

Wu, Li Fen, Pei Chung Chen, and Chi Mei Lee. 2013. “The Effects of Nitrogen Sources and Temperature on Cell Growth and Lipid Accumulation of Microalgae.” *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 506–10. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830513001984?via%3Dihub> (November 23, 2018).

Xiao, Yan et al. 2015. “Simultaneous Accumulation of Neutral Lipids and Biomass in *Nannochloropsis Oceanica* IMET1 under High Light Intensity and Nitrogen Replete Conditions.” *Algal Research* 11: 55–62. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926415001393> (November 12, 2018).

Yang, Li, Hiroto Maeda, Takeshi Yoshikawa, and Gui-qin Zhou. 2012. “Algicidal Effect of Bacterial Isolates of *Pedobacter* Sp. against *Cyanobacterium Microcystis Aeruginosa*.” *Water Science and Engineering* 5(4): 375–82. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674237015302118> (November 14, 2018).

Yang, Qiuchan et al. 2015. “Toxic Effect of a Marine Bacterium on Aquatic Organisms and Its Algicidal Substances against *Phaeocystis Globosa*” ed. Wei-Chun Chin. *PLOS*

ONE 10(2): e0114933. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0114933> (November 14, 2018).

Yang, Ying, Benjamin Mininberg, Andrea Tarbet, and Pamela Weathers. 2013. "At High Temperature Lipid Production in *Ettlia Oleoabundans* Occurs before Nitrate Depletion." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(5): 2263–73. <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4671-2>.

Yao, Shuo, Anders Brandt, Helge Egsgaard, and Claes Gjermansen. 2012. "Neutral Lipid Accumulation at Elevated Temperature in Conditional Mutants of Two Microalgae Species." *Plant Physiology and Biochemistry* 61: 71–79. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942812002501>.

Yap, Benjamin H.J. et al. 2016. "Nitrogen Deprivation of Microalgae: Effect on Cell Size, Cell Wall Thickness, Cell Strength, and Resistance to Mechanical Disruption." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43(12): 1671–80.

Yap, Benjamin H J et al. 2014. "A Mechanistic Study of Algal Cell Disruption and Its Effect on Lipid Recovery by Solvent Extraction." *Algal Research* 5: 112–20. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926414000575>.

Ye, Weihua, Jobst Liebau, and Lena Mäler. 2013. "New Membrane Mimetics with Galactolipids: Lipid Properties in Fast-Tumbling Bicelles." *The Journal of Physical Chemistry B* 117(4): 1044–50. <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp311093p>.

Zheng, Yi, Rui Xiao, and Mark Roberts. 2016. "Polymer-Enhanced Enzymatic Microalgal Cell Disruption for Lipid and Sugar Recovery." *Algal Research* 14: 100–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.010>.

Zhu, Liandong et al. 2017. "Using Microalgae to Produce Liquid Transportation Biodiesel : What Is Next ?" *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 78(May): 391–

400. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.089>.

Zuorro, Antonio, Selenia Miglietta, Giuseppe Familiari, and Roberto Lavecchia. 2016. "Enhanced Lipid Recovery from Nannochloropsis Microalgae by Treatment with Optimized Cell Wall Degrading Enzyme Mixtures." *Bioresource Technology* 212: 35–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.025>.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Magda Patricia Vargas Pérez

Candidato para el Grado de

Doctora en Ciencias con Orientación en Biotecnología

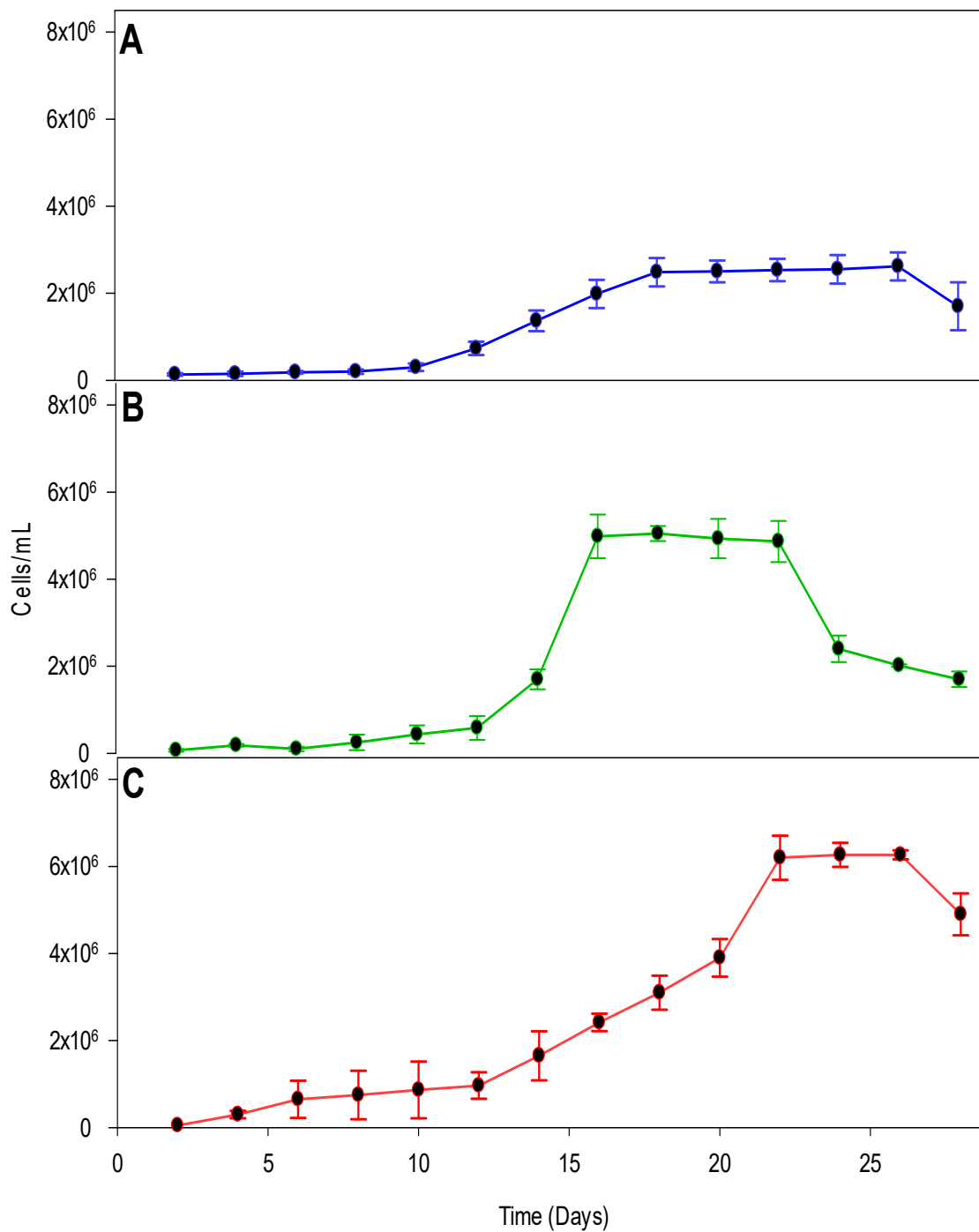
Tesis: ACTIVIDAD LÍTICA DEL PÉPTIDO MELITINA SOBRE *Neochloris oleoabundans* (CHLOROPHYTA) PARA POTENCIAR LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS.

Campo de Estudio: Biotecnología ambiental

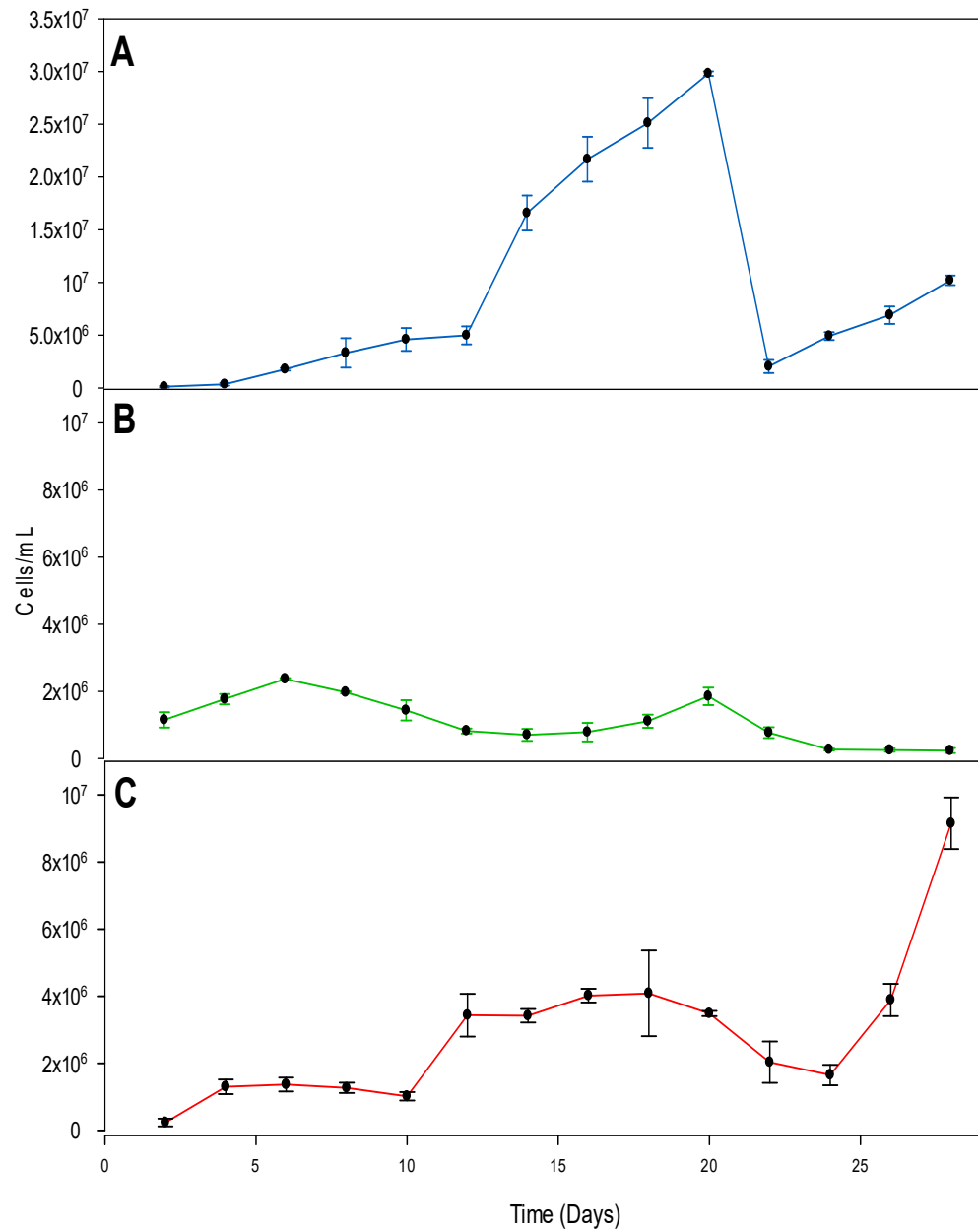
Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 5 de mayo de 1992, hija de Víctor Efraín Vargas Llanes y Elsa Patricia Pérez de León.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2015 mediante tesis de investigación.

Experiencia Profesional: Asistente de laboratorio en el L2 del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2015, Profesora de Ciencias en Colegio Mujeres Ciudad de los Niños desde 2018.



Anexo 1. Curvas de crecimiento de la microalga *N. oleoabundans* en fotobiorreactores bajo una temperatura de 25°C. A: N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: N 14.71mM, P 6.42mM.



Anexo 2. Curvas de crecimiento de la microalga *N. oleoabundans* en fotobiorreactores bajo una temperatura de 25°C. A: N 0.642 mM, P 1.47 mM. B: N 2.94 mM, P 1.29 mM. C: N 14.71mM, P 6.42mM.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

-% DE DISRUPCIÓN CELULAR

Estadísticos descriptivos				
Temperatura	Nutrientes	Media	Desviación típica	N
25	SB	13.5544	3.62104	3
	SN	15.9011	3.34412	3
	SA	12.6178	2.48494	3
	Total	14.0244	3.12459	9
32	SB	26.3501	3.59803	3
	SN	52.1900	4.29087	3
	SA	83.6333	3.74329	3
	Total	54.0578	25.07114	9
Total	SB	19.9523	7.71632	6
	SN	34.0456	20.17184	6
	SA	48.1256	39.00049	6
	Total	34.0411	26.91885	18

Para demostrar homogeneidad de los datos

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^a

F	gl1	gl2	Sig.
.119	5	12	.986

Para demostrar normalidad de los datos

Temperatura	Nutrientes			VAR00003
25	SB	N		3
		Parámetros normales ^{a,b}	Media	13.5544
			Desviación típica	3.62104
		Diferencias más extremas	Absoluta	.220
			Positiva	.220
			Negativa	-.189
		Z de Kolmogorov-Smirnov		.381
		Sig. asintót. (bilateral)		.999

	SN	N		3
		Parámetros normales ^{a,b}	Media	15.9011
			Desviación típica	3.34412
		Diferencias más extremas	Absoluta	.338
			Positiva	.338
			Negativa	-.241
		Z de Kolmogorov-Smirnov		.585
		Sig. asintót. (bilateral)		.884
	SA	N		3
		Parámetros normales ^{a,b}	Media	12.6178
			Desviación típica	2.48494
		Diferencias más extremas	Absoluta	.367
			Positiva	.367
			Negativa	-.265
		Z de Kolmogorov-Smirnov		.635
		Sig. asintót. (bilateral)		.814
32	SB	N		3
		Parámetros normales ^{a,b}	Media	26.3501
			Desviación típica	3.59803
		Diferencias más extremas	Absoluta	.278
			Positiva	.278
			Negativa	-.204
		Z de Kolmogorov-Smirnov		.482
		Sig. asintót. (bilateral)		.974
	SN	N		3
		Parámetros normales ^{a,b}	Media	52.1900
			Desviación típica	4.29087
		Diferencias más extremas	Absoluta	.177
			Positiva	.177
			Negativa	-.176
		Z de Kolmogorov-Smirnov		.307
		Sig. asintót. (bilateral)		1.000
	SA	N		3
		Parámetros normales ^{a,b}	Media	83.6333
			Desviación típica	3.74329
		Diferencias más extremas	Absoluta	.232
			Positiva	.192
			Negativa	-.232
		Z de Kolmogorov-Smirnov		.402
		Sig. asintót. (bilateral)		.997
a. La distribución de contraste es la Normal.				
b. Se han calculado a partir de los datos.				

Decisión: El valor P señalado es mayor a 0,05. Ho se acepta.

Conclusión: Todos los grupos formados todos tienen distribución normal y homogeneidad de varianzas.

Análisis de varianza (ANOVA)

Hipótesis:

Ho: El porcentaje de disrupción celular por medio del péptido, es igual en las células de microalgas cultivadas a las dos diferentes temperaturas y las tres diferentes concentraciones de nutrientes.

Ha: El porcentaje de disrupción celular por medio del péptido, es diferente en las células de microalgas cultivadas a las dos diferentes temperaturas y las tres diferentes concentraciones de nutrientes.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: VAR00003

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	12166.939 ^a	5	2433.388	192.516	.000
Intersección	20858.357	1	20858.357	1650.194	.000
Temperatura	7212.017	1	7212.017	570.574	.000
Nutrientes	2381.205	2	1190.602	94.194	.000
Temperatura *	2573.718	2	1286.859	101.809	.000
Nutrientes					
Error	151.679	12	12.640		
Total	33176.976	18			
Total corregida	12318.619	17			

a. R cuadrado = .988 (R cuadrado corregida = .983)

Decisión: Ho se rechaza debido a que el valor de P es < 0.05 por lo tanto, es significativo.

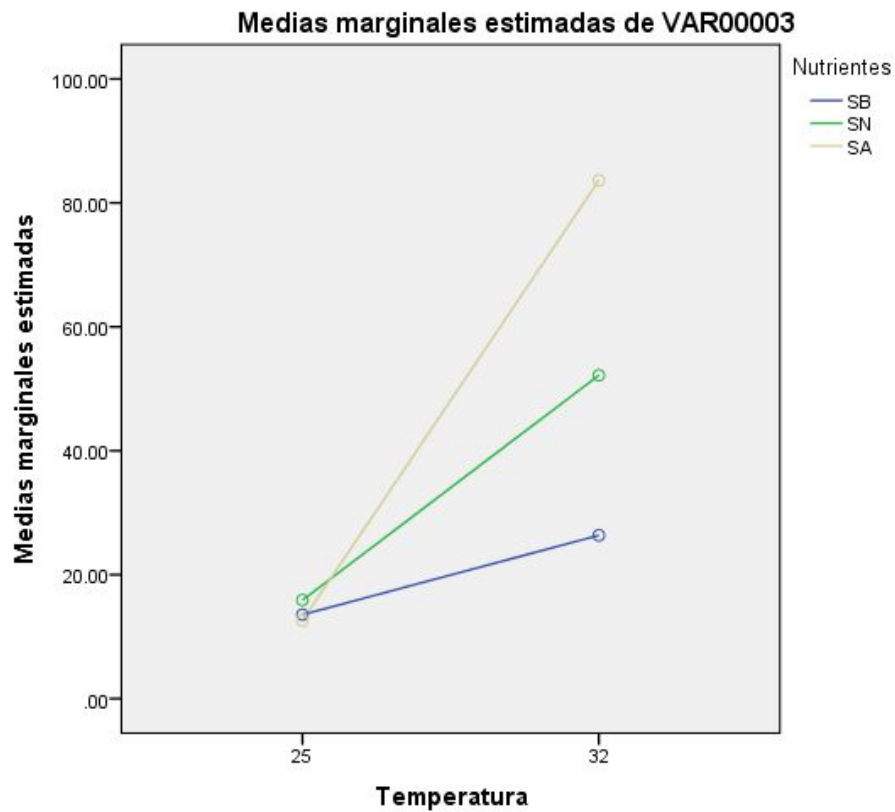
Conclusión: Existe diferencia en el porcentaje de disrupción celular con el tratamiento del péptido sobre las células cultivadas a 25°C y 32° C y a las diferentes concentraciones de nutrientes.

POST HOC Comparaciones múltiples

DHS de Tukey

(I) Nutrientes	(J) Nutrientes	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
SB	SN	-14.0933*	2.05264	.000	-19.5695	-8.6171
	SA	-28.1733*	2.05264	.000	-33.6495	-22.6971
SN	SB	14.0933*	2.05264	.000	8.6171	19.5695
	SA	-14.0800*	2.05264	.000	-19.5562	-8.6038
SA	SB	28.1733*	2.05264	.000	22.6971	33.6495
	SN	14.0800*	2.05264	.000	8.6038	19.5562

Conclusión: Existe efecto al usar diferente temp. 25° y 32°. Existe una interacción positiva entre los nutrientes.



% DE LÍPIDOS EXTRAÍDOS POR GRAVIMETRÍA

Prueba T

Estadísticos de grupo

	Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
lípidos	Melitina	3	85.293333	1.4403588	.8315915
	Control	3	46.140000	.9026627	.5211526

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza	
								Inferior	Superior
lípidos	1.070	.359	39.895	4	.000	39.1533333	.9813992	36.4285323	41.8781344
			39.895	3.361	.000	39.1533333	.9813992	36.2115627	42.0951039

Prueba de Levine para determinar igualdad de varianzas:

Ho: Todas las varianzas son iguales

Ha: Todas las varianzas son diferentes.

Decisión y conclusión: Ho se rechaza debido a que el nivel de significancia para la prueba de Levine fue de 0.359 siendo mayor que $\alpha=0.05$ por lo tanto las varianzas son iguales.

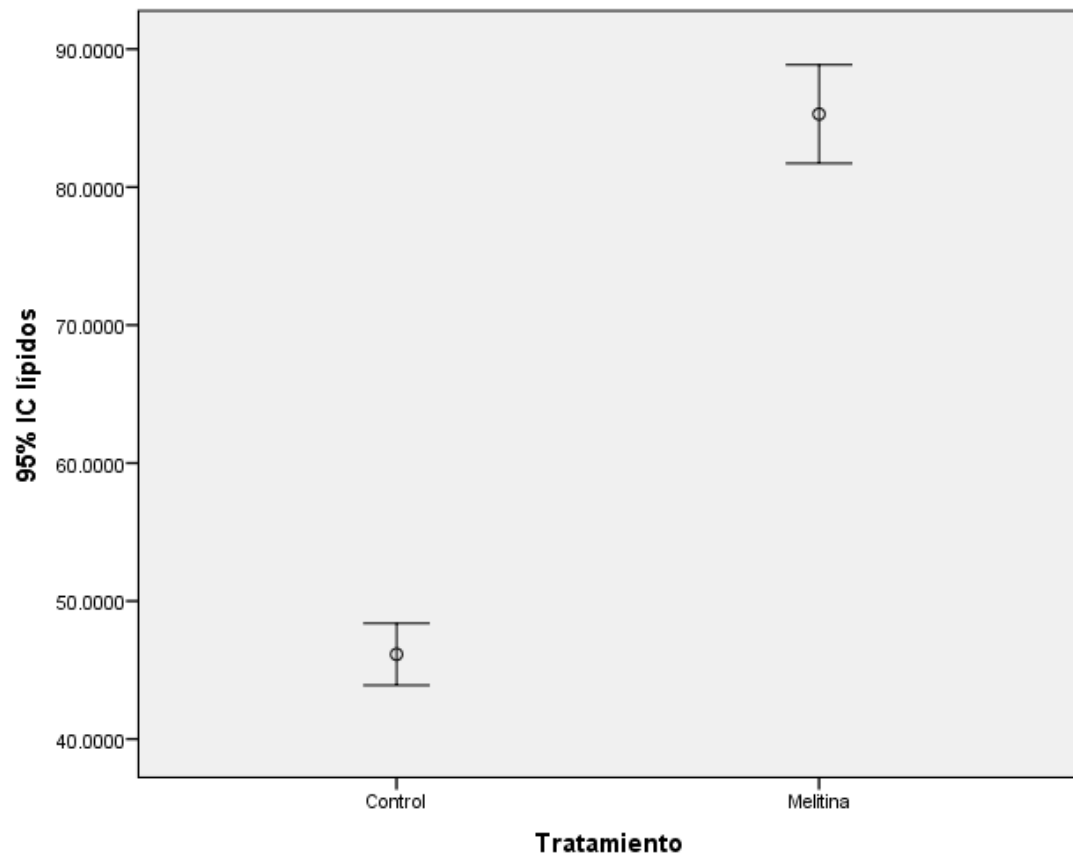
Prueba de T-student:

Ho: No existe diferencia entre el tratamiento y el control.

Ha: Existe diferencia entre el tratamiento y el control.

Decisión: El valor de P fue de 0.05 lo cual es menor que 0.05, por lo tanto, Ho se rechaza

Conclusión: Existe diferencia significativa entre el tratamiento y el control.



PRUEBAS DE COMPARACION DE MEDIAS: T STUDENT PARA IF Y EQUIVALENTES DE TRIOLEINA

IF SUSPENSIÓN

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
IFsuspT1SB 1	3	8.79	.819	.473
2	3	10.09	1.008	.582
IFsuspT1SN 1	3	11.6205	.53884	.31110
2	3	13.5877	1.35450	.78202
IFsuspT1SA 1	3	6.6740	1.32635	.76577
2	3	8.9195	2.13879	1.23483
IFsuspT2SB 1	3	13.4365	.74696	.43126
2	3	14.1262	.74487	.43005
IFsuspT2SN 1	3	15.0550	.30860	.17817
2	3	31.1383	.36841	.21270
IFsuspT2SA 1	3	36.4300	2.11000	1.21821
2	3	57.6587	3.95504	2.28344

HIPÓTESIS

Prueba de Levene

Ho: Las varianzas de la variable dependiente son iguales.

Ha: Las varianzas de la variable dependiente son diferentes.

Decisión: Ho se acepta debido a que el valor de $P > 0.05$.

Pruebas T-student

Ho: No hay diferencia entre los valores de IF del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Ha: Existe diferencia entre los valores de IF del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Condición	Decisión
25° SB	Ho se acepta
25° SN	Ho se acepta
25° SA	Ho se acepta
32° SB	Ho se acepta
32° SN	Ho se rechaza
32° SA	Ho se rechaza

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
IFsuspT1SB	Se han asumido varianzas iguales	.389	.567	-1.729	4	.159	-1.297	.750	-3.379	.785
	No se han asumido varianzas iguales			-1.729	3.838	.162	-1.297	.750	-3.414	.820
IFsuspT1SN	Se han asumido varianzas iguales	1.226	.330	-2.337	4	.080	-1.96723	.84163	-4.30397	.36950
	No se han asumido varianzas iguales			-2.337	2.618	.114	-1.96723	.84163	-4.88126	.94680
IFsuspT1SA	Se han asumido varianzas iguales	1.037	.366	-1.545	4	.197	-2.24547	1.45300	-6.27964	1.78870
	No se han asumido varianzas iguales			-1.545	3.340	.211	-2.24547	1.45300	-6.61427	2.12334
IFsuspT2SB	Se han asumido varianzas iguales	.000	.991	-1.132	4	.321	-.68967	.60904	-2.38063	1.00129
	No se han asumido varianzas iguales			-1.132	4.000	.321	-.68967	.60904	-2.38063	1.00130
IFsuspT2SN	Se han asumido varianzas iguales	.369	.577	-57.966	4	.000	-16.08330	.27746	-16.85366	-15.31294
	No se han asumido varianzas iguales			-57.966	3.881	.000	-16.08330	.27746	-16.86309	-15.30351
IFsuspT2SA	Se han asumido varianzas iguales	.847	.409	-8.202	4	.001	-21.22867	2.58808	-28.41432	-14.04301
	No se han asumido varianzas iguales			-8.202	3.053	.004	-21.22867	2.58808	-29.38455	-13.07279

IF PELLET

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
IFpelletT1SB 1	3	7.2533	.49254	.28437
2	3	7.1224	.94449	.54530
IFpelletT1SN 1	3	5.3541	.73677	.42537
2	3	7.2673	1.16494	.67258
IFpelletT1SA 1	3	5.3171	1.06180	.61303
2	3	7.6878	1.70710	.98560
IFpelletT2SB 1	3	7.4933	.53714	.31012
2	3	8.2171	2.19568	1.26768
IFpelletT2SN 1	3	12.8736	1.52010	.87763
2	3	19.9686	3.29437	1.90201
IFpelletT2SA 1	3	27.9043	.99213	.57281
2	3	47.8960	1.89688	1.09517

HIPÓTESIS

Prueba de Levene

Ho: Las varianzas de la variable dependiente son iguales.

Ha: Las varianzas de la variable dependiente son diferentes.

Decisión: Ho se acepta debido a que el valor de $P > 0.05$.

Pruebas T-student

Ho: No hay diferencia entre los valores de IF PELLET del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Ha: Existe diferencia entre los valores de IF PELLET del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Condición	Decisión
25° SB	Ho se acepta
25° SN	Ho se acepta
25° SA	Ho se acepta
32° SB	Ho se acepta
32° SN	Ho se rechaza
32° SA	Ho se rechaza

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
IFpelletT1SB	Se han asumido varianzas iguales	1.357	.309	.213	4	.842	.13093	.61499	-1.57657	1.83843
	No se han asumido varianzas iguales			.213	3.013	.845	.13093	.61499	-1.82153	2.08340
IFpelletT1SN	Se han asumido varianzas iguales	1.127	.348	-2.404	4	.074	-1.91320	.79580	-4.12271	.29631
	No se han asumido varianzas iguales			-2.404	3.379	.086	-1.91320	.79580	-4.29235	.46595
IFpelletT1SA	Se han asumido varianzas iguales	1.138	.346	-2.043	4	.111	-2.37073	1.16069	-5.59333	.85186
	No se han asumido varianzas iguales			-2.043	3.346	.124	-2.37073	1.16069	-5.85760	1.11613
IFpelletT2SB	Se han asumido varianzas iguales	2.463	.192	-.555	4	.609	-.72380	1.30506	-4.34722	2.89962
	No se han asumido varianzas iguales			-.555	2.239	.630	-.72380	1.30506	-5.80285	4.35525
IFpelletT2SN	Se han asumido varianzas iguales	3.752	.125	-3.387	4	.028	-7.09500	2.09472	-12.91088	-1.27912
	No se han asumido varianzas iguales			-3.387	2.815	.047	-7.09500	2.09472	-14.01661	-.17339
IFpelletT2SA	Se han asumido varianzas iguales	1.716	.260	-16.176	4	.000	-19.99173	1.23592	-23.42320	-16.56027
	No se han asumido varianzas iguales			-16.176	3.018	.000	-19.99173	1.23592	-23.91170	-16.07177

IF SOBRENADANTE

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación tip.	Error típ. de la media
IFspnT1SB 1	3	2.5233	.83158	.48011
2	3	2.8153	.32408	.18711
IFspnT1SN 1	3	5.6524	.69031	.39855
2	3	6.7800	.54889	.31690
IFspnT1SA 1	3	1.0965	.00690	.00398
2	3	1.2505	.24871	.14359
IFspnT2SB 1	3	5.3557	.83722	.48337
2	3	8.7579	1.59932	.92337
IFspnT2SN 1	3	7.4552	.86978	.50217
2	3	11.1146	.16028	.09254
IFspnT2SA 1	3	7.6901	.89934	.51923
2	3	9.9269	.94641	.54641

HIPÓTESIS

Prueba de Levene

Ho: Las varianzas de la variable dependiente son iguales.

Ha: Las varianzas de la variable dependiente son diferentes.

Decisión: Ho se acepta debido a que el valor de $P > 0.05$.

Pruebas T-student

Ho: No hay diferencia entre los valores de IF SOBRENADANTE del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Ha: Existe diferencia entre los valores de IF SOBRENADANTE del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Condición	Decisión
25° SB	Ho se acepta
25° SN	Ho se acepta
25° SA	Ho se acepta
32° SB	Ho se acepta
32° SN	Ho se rechaza
32° SA	Ho se rechaza

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
IFspnT1SB	Se han asumido varianzas iguales	4.937	.090	-.567	4	.601	-.29203	.51528	-1.72269	1.13862
	No se han asumido varianzas iguales			-.567	2.594	.616	-.29203	.51528	-2.08718	1.50312
IFspnT1SN	Se han asumido varianzas iguales	.317	.603	-2.215	4	.091	-1.12763	.50919	-2.54136	.28609
	No se han asumido varianzas iguales			-2.215	3.807	.095	-1.12763	.50919	-2.57012	.31485
IFspnT1SA	Se han asumido varianzas iguales	14.965	.018	-1.072	4	.344	-.15397	.14365	-.55280	.24487
	No se han asumido varianzas iguales			-1.072	2.003	.396	-.15397	.14365	-.77113	.46320
IFspnT2SB	Se han asumido varianzas iguales	2.718	.175	-3.264	4	.031	-3.40217	1.04223	-6.29587	-.50846
	No se han asumido varianzas iguales			-3.264	3.020	.047	-3.40217	1.04223	-6.70689	-.09745
IFspnT2SN	Se han asumido varianzas iguales	9.726	.036	-7.167	4	.002	-3.65943	.51062	-5.07715	-2.24172
	No se han asumido varianzas iguales			-7.167	2.136	.016	-3.65943	.51062	-5.72799	-1.59088
IFspnT2SA	Se han asumido varianzas iguales	.000	.991	-2.968	4	.041	-2.23683	.75377	-4.32964	-.14403
	No se han asumido varianzas iguales			-2.968	3.990	.041	-2.23683	.75377	-4.33178	-.14188

EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-SUSPENSIÓN

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
eqtrioleinsuspT1SB 1	3	1.0720	.04693	.02709
2	3	1.1463	.05780	.03337
eqtrioleinsuspT1SN 1	3	1.2342	.03089	.01783
2	3	1.3470	.07765	.04483
eqtrioleinsuspT1SA 1	3	.9507	.07605	.04391
2	3	1.0794	.12263	.07080
eqtrioleinsuspT2SB 1	3	1.3383	.04281	.02472
2	3	1.3779	.04270	.02465
eqtrioleinsuspT2SN 1	3	1.4311	.01771	.01023
2	3	2.3409	.02113	.01220
eqtrioleinsuspT2SA 1	3	2.6565	.12095	.06983
2	3	3.8735	.22674	.13091

HIPÓTESIS

Prueba de Levene

Ho: Las varianzas de la variable dependiente son iguales.

Ha: Las varianzas de la variable dependiente son diferentes.

Decisión: Ho se acepta debido a que el valor de $P > 0.05$.

Pruebas T-student

Ho: No hay diferencia entre los valores de EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-SUSPENSIÓN del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Ha: Existe diferencia entre los valores de EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-SUSPENSIÓN del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas

Condición	Decisión
25° SB	Ho se acepta
25° SN	Ho se acepta
25° SA	Ho se acepta
32° SB	Ho se acepta
32° SN	Ho se rechaza
32° SA	Ho se rechaza

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
eqtrioleinsuspT1SB	Se han asumido varianzas iguales	.387	.568	-1.728	4	.159	-.07427	.04299	-.19361	.04508
	No se han asumido varianzas iguales			-1.728	3.838	.162	-.07427	.04299	-.19563	.04709
eqtrioleinsuspT1SN	Se han asumido varianzas iguales	1.227	.330	-2.338	4	.080	-.11280	.04825	-.24676	.02116
	No se han asumido varianzas iguales			-2.338	2.618	.114	-.11280	.04825	-.27985	.05425
eqtrioleinsuspT1SA	Se han asumido varianzas iguales	1.037	.366	-1.545	4	.197	-.12873	.08331	-.36004	.10258
	No se han asumido varianzas iguales			-1.545	3.340	.211	-.12873	.08331	-.37922	.12176
eqtrioleinsuspT2SB	Se han asumido varianzas iguales	.000	.991	-1.132	4	.321	-.03953	.03491	-.13646	.05739
	No se han asumido varianzas iguales			-1.132	4.000	.321	-.03953	.03491	-.13646	.05739
eqtrioleinsuspT2SN	Se han asumido varianzas iguales	.367	.577	-57.151	4	.000	-.90977	.01592	-.95396	-.86557
	No se han asumido varianzas iguales			-57.151	3.882	.000	-.90977	.01592	-.95450	-.86503
eqtrioleinsuspT2SA	Se han asumido varianzas iguales	.848	.409	-8.203	4	.001	-1.21700	.14837	-1.62893	-.80507
	No se han asumido varianzas iguales			-8.203	3.053	.004	-1.21700	.14837	-1.68457	-.74943

EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-PELLET

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
eqtrioleinpelletT1 SB 1	3	.9976	.03077	.01776
2	3	1.0840	.14520	.08383
eqtrioleinpelletT1 SN 1	3	1.3037	.08986	.05188
2	3	1.7128	.18888	.10905
eqtrioleinpelletT1 SA 1	3	2.1677	.05690	.03285
2	3	3.3138	.10879	.06281
eqtrioleinpelletT2 SB 1	3	.9959	.03112	.01797
2	3	1.0840	.14520	.08383
eqtrioleinpelletT2 SN 1	3	1.3060	.08714	.05031
2	3	1.7128	.18888	.10905
eqtrioleinpelletT2 SA 1	3	2.1677	.05690	.03285
2	3	3.3138	.10879	.06281

HIPÓTESIS

Prueba de Levene

Ho: Las varianzas de la variable dependiente son iguales.

Ha: Las varianzas de la variable dependiente son diferentes.

Decisión: Ho se acepta debido a que el valor de $P > 0.05$.

Pruebas T-student

Ho: No hay diferencia entre los valores de EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-PELLET del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Ha: Existe diferencia entre los valores de EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-PELLET del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas

Condición	Decisión
25° SB	Ho se acepta
25° SN	Ho se rechaza
25° SA	Ho se rechaza
32° SB	Ho se acepta
32° SN	Ho se rechaza
32° SA	Ho se rechaza

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
eqtrioleinpelletT1SB	Se han asumido varianzas iguales	9.413	.037	-1.007	4	.371	-.08633	.08569	-.32426	.15159
	No se han asumido varianzas iguales			-1.007	2.179	.412	-.08633	.08569	-.42746	.25479
eqtrioleinpelletT1SN	Se han asumido varianzas iguales	3.490	.135	-3.388	4	.028	-.40910	.12076	-.74439	-.07381
	No se han asumido varianzas iguales			-3.388	2.861	.046	-.40910	.12076	-.80418	-.01402
eqtrioleinpelletT1SA	Se han asumido varianzas iguales	1.716	.260	-16.169	4	.000	-1.14607	.07088	-1.34287	-.94927
	No se han asumido varianzas iguales			-16.169	3.018	.000	-1.14607	.07088	-1.37088	-.92125
eqtrioleinpelletT2SB	Se han asumido varianzas iguales	9.368	.038	-1.028	4	.362	-.08810	.08574	-.32614	.14994
	No se han asumido varianzas iguales			-1.028	2.183	.404	-.08810	.08574	-.42885	.25265
eqtrioleinpelletT2SN	Se han asumido varianzas iguales	3.753	.125	-3.387	4	.028	-.40677	.12010	-.74021	-.07332
	No se han asumido varianzas iguales			-3.387	2.815	.047	-.40677	.12010	-.80362	-.00991
eqtrioleinpelletT2SA	Se han asumido varianzas iguales	1.716	.260	-16.169	4	.000	-1.14607	.07088	-1.34287	-.94927
	No se han asumido varianzas iguales			-16.169	3.018	.000	-1.14607	.07088	-1.37088	-.92125

EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-SOBRENADANTE

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
eqtrioleinSPNT1SB 1	3	.8751	.04801	.02772
2	3	.8760	.13867	.08006
eqtrioleinSPNT1SN 1	3	.9954	.04984	.02877
2	3	1.0532	.27125	.15661
eqtrioleinSPNT1SA 1	3	1.0089	.05153	.02975
2	3	1.1371	.05427	.03133
eqtrioleinSPNT2SB 1	3	.8751	.04801	.02772
2	3	.8760	.13867	.08006
eqtrioleinSPNT2SN 1	3	.9954	.04984	.02877
2	3	1.0532	.27125	.15661
eqtrioleinSPNT2SA 1	3	1.0089	.05153	.02975
2	3	1.1371	.05427	.03133

HIPÓTESIS

Prueba de Levene

Ho: Las varianzas de la variable dependiente son iguales. Ha: Las varianzas de la variable dependiente son diferentes.

Decisión: Ho se acepta debido a que el valor de $P > 0.05$.

Pruebas T-student

Ho: No hay diferencia entre los valores de EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-SOBRENADANTE del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas.

Ha: Existe diferencia entre los valores de EQUIVALENTES DE TRIOLEINA-SSOBRENADANTE del control y el tratamiento de cada condición en la que fueron cultivadas las microalgas

Condición	Decisión
25° SB	Ho se acepta
25° SN	Ho se acepta
25° SA	Ho se rechaza
32° SB	Ho se acepta
32° SN	Ho se acepta
32° SA	Ho se rechaza

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
eqtrioleinSPNT1SB	Se han asumido varianzas iguales	1.632	.271	-.011	4	.991	-.00097	.08473	-.23620	.23427
	No se han asumido varianzas iguales			-.011	2.473	.992	-.00097	.08473	-.30623	.30430
eqtrioleinSPNT1SN	Se han asumido varianzas iguales	10.282	.033	-.363	4	.735	-.05773	.15923	-.49982	.38436
	No se han asumido varianzas iguales			-.363	2.135	.750	-.05773	.15923	-.70299	.58752
eqtrioleinSPNT1SA	Se han asumido varianzas iguales	.000	.990	-2.968	4	.041	-.12823	.04321	-.24819	-.00827
	No se han asumido varianzas iguales			-2.968	3.989	.041	-.12823	.04321	-.24832	-.00815
eqtrioleinSPNT2SB	Se han asumido varianzas iguales	1.632	.271	-.011	4	.991	-.00097	.08473	-.23620	.23427
	No se han asumido varianzas iguales			-.011	2.473	.992	-.00097	.08473	-.30623	.30430
eqtrioleinSPNT2SN	Se han asumido varianzas iguales	10.282	.033	-.363	4	.735	-.05773	.15923	-.49982	.38436
	No se han asumido varianzas iguales			-.363	2.135	.750	-.05773	.15923	-.70299	.58752
eqtrioleinSPNT2SA	Se han asumido varianzas iguales	.000	.990	-2.968	4	.041	-.12823	.04321	-.24819	-.00827
	No se han asumido varianzas iguales			-2.968	3.989	.041	-.12823	.04321	-.24832	-.00815